

# Analyse der Struktur und Funktion von pflanzlichen sHSPs

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- *Dr. rer. nat.* –

Vorgelegt von

Dipl.-Biol. Benjamin Dennis Eisenhardt

geboren am 14.2.1984 in Friedberg / Hessen

Angefertigt am Institut für Pflanzenphysiologie

im Fachbereich 08 – Biologie und Chemie

der Justus-Liebig Universität Gießen

Gießen 2012

1. Gutachter:

PD Dr. Christoph Forreiter

Abteilung Biologie, Department Chemie-Biologie

Naturwissenschaftliche-technische Fakultät der Universität Siegen

Adolf-Reichwein Straße 2, 57076 Siegen

2. Gutachter:

Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie

FB08 der Justus-Liebig Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	1
Publikationen und Posterbeiträge .....	2
Zusammenfassung .....	3
1 Einleitung .....	5
1.1 Die Familie der kleinen Hitzestressproteine .....	6
1.2 Struktur und molekulare Funktion von kleinen Hitzestressproteinen .....	10
1.3 Ein neuer sHSP Klient: Das Phytochrom CPH1 $\Delta$ 2 .....	14
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	16
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Materialien .....	17
2.1.1 Software .....	17
2.1.2 Verwendete Präparations- / Reinigungskits und Säulen .....	17
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	18
2.1.4 Nähr- bzw. Anzuchtmedien .....	19
2.1.5 Lebendmaterial .....	21
2.1.6 Enzyme und sonstige Proteine .....	21
2.1.7 Primer .....	23
2.1.8 Plasmide .....	24
2.1.9 Chemikalien .....	25
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Anzucht, Stressbehandlung und Ernte der <i>A. thaliana</i> .....	27
2.2.2 Vervielfältigung der sHSP cDNA – Sequenzen .....	27
2.2.3 Plasmidklonierungen .....	30
2.2.4 Isolierung, Identifizierung und Sicherung rekombinanter Plasmide .....	31
2.2.5 Expression und Reinigung der zu untersuchenden Proteine .....	32
2.2.6 Interaktionsanalyse .....	33
2.2.7 Strukturanalyse kleine Hitzestressproteine .....	35
2.2.8 Funktionsanalyse kleiner Hitzestressproteine .....	37
3 Ergebnisse .....	39
3.1 sHSP cDNA Isolierung, Klonierung und Proteinexpression .....	39
3.1.1 cDNA Synthese mit anschließender sHSP cDNA Isolierung .....	39
3.1.2 Expression und Reinigung von sHSPs für weitere Analysen .....	41
3.2 Interaktionsanalyse .....	43
3.2.1 <i>In vivo</i> sHSP Lokalisationsstudien .....	43
3.2.2 Interaktionsanalyse mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems .....	47
3.2.3 Affinitätschromatographie basierte <i>pull-down</i> Analyse .....	54

3.2.4	CD-Spektroskopische Analysen einiger sHSP-Interaktionen .....	56
3.3	Vergleichende Strukturanalyse bei verschiedenen Temperaturen .....	57
3.3.1	Analyse der Proteinaggregation (Löslichkeit) bei hohen Temperaturen .....	57
3.3.2	CD-Spektroskopische Sekundärstrukturanalyse .....	58
3.3.3	bis-ANS Untersuchungen zu Oberflächendynamiken .....	61
3.3.4	Quartäre Strukturanalyse mittels Blue Native PAGE und SEC .....	63
3.4	Funktionsanalyse .....	70
3.4.1	MDH als Klient .....	71
3.4.2	CPH1 $\Delta$ 2 als Klient .....	73
3.4.3	Analyse der sHSP / Klienten Interaktionen .....	75
3.4.4	Exemplarische <i>in vivo</i> Funktionsstudie .....	79
4	Diskussion .....	80
4.1	Interaktionsanalyse .....	82
4.2	Strukturanalyse .....	87
4.3	Funktionsanalyse .....	95
4.4	Gesamtbetrachtung / Ausblick .....	98
5	Literaturverzeichnis .....	102
6	Anhang .....	111
6.1	Schematische Übersicht der verwendeten Vektoren .....	111
7	Danksagung .....	113

## Abkürzungen

AD = *Activation Domain* (Aktivatordomäne)

AS = Aminosäuren

BD = *Binding Domain* (Bindedomäne)

BN-PAGE = *Blue Native Polyacrylamide Gelelectrophoresis*

CaMV = *Cauliflower Mosaic Virus* (Blumenkohl Mosaik Virus)

CD = *Circular Dichroism*

CI bzw. CII = Klasse 1 und Klasse 2

eCFP = *enhanced Cyan Fluorescent Protein*

eYFP = *enhanced Yellow Fluorescent Protein*

HRP = *Horse Radish Peroxidase* (Meerrettichperoxidase)

HS = Hitzestress

HSP(s) = Hitzeschockprotein(e) / Hitzestressprotein(e)

MDH = Malatdehydrogenase

Ni-Agarose = Nickel Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA; *nitriloacetic acid*) Agarose

NLS = *Nuclear Localization Signal*

ONPG = 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

R-250 = Coomassie *Brilliant Blue* R-250

rpm = *rotations per minute* (Umdrehungen pro Minute)

SDS-PAGE = *Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis*

SEC = *Size Exclusion Chromatography* (Gelfiltrationschromatographie)

sHSP(s) = kleine Hitzeschockprotein(e) / kleine Hitzestressprotein(e)

TEV = *Tobacco Etch Virus* (Tabak Ätzvirus)

YTH = *Yeast 2-Hybrid* (Hefe 2-Hybrid)

## **Publikationen und Posterbeiträge**

Die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Arbeiten wurden zwischen dem 31.3.2009 – 30.4.2012 an dem Institut für Pflanzenphysiologie und dem Institut für Biochemie an der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht oder befinden sich im Begutachtungsprozess:

1. Eisenhardt B, Forreiter C (2012); Insights in small Heat Shock Protein / client interaction by combined protection analysis of two different client proteins (FEBSletters, in press).
2. Eisenhardt B, Olbrich C, Forreiter C; Comparative studies on class I and II sHSPs from Arabidopsis (submitted).

## **Posterbeiträge**

1. 24. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen, 22. – 25.02.2011, in Dabringhausen (Deutschland)
2. Botanikertagung 2011: Diversity makes the difference, 18. – 23.09.2011 in Berlin (Deutschland)

## Zusammenfassung

In Pflanzen werden im Zuge transienter Anpassungen an übermäßige Wärmeeinwirkung, der sogenannten Akklimatisierung oder Härtung, unter anderem Hitzestressproteine exprimiert. Diese wurden aufgrund ihres molekularen Gewichtes in verschiedene Klassen unterteilt (HSP100, 90, 70, 60, 40). Alle induzierten Proteine mit einem molekularen Gewicht unter 40 kDa wurden in die Klasse der kleinen Hitzestressproteine (sHSPs) eingeordnet. Besonders bei Pflanzen wurde im Vergleich zu anderen Organismen eine große Zahl an sHSPs gefunden. Aufgrund der Vielzahl der gefundenen sHSPs wurden diese nach ihrer zellulären Lokalisation in verschiedene Unterklassen unterteilt. Die zytoplasmatische Unterklasse hatte die meisten Mitglieder, so dass anhand von Sequenzstudien eine weitere Unterteilung der zytoplasmatischen sHSPs stattfand. In Arabidopsis waren die größten Klassen die zytosolischen Klassen 1 und 2, mit sechs und zwei Mitgliedern. sHSPs können andere entfaltete oder sich entfaltende Proteine binden, um diese vor Denaturierung durch unspezifische Interaktionen (Aggregation) zu schützen. Aufgrund der Vielzahl der Mitglieder der zytosolischen Klassen 1 und 2 stellte sich die Frage der funktionellen Redundanz, so dass eine vergleichende Katalogisierung der Eigenschaften der einzelnen Mitglieder durchgeführt werden sollte. Ausgehend von einer vergleichenden Interaktionsanalyse wurde die Struktur und Funktion von sHSPs der zytosolischen Klassen 1 und 2 aus Arabidopsis untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die untersuchten sHSPs nicht allein aufgrund ihres dokumentierten Verhaltens einer zytosolischen Klasse einzuordnen waren. Nicht alle Klasse 2 Proteine zeigten während den durchgeführten *in vivo* Lokalisationsstudien eine für diese Klasse typische Hitze induzierbare *Heat Stress Granules* Bildung (HSG). Eine Rekrutierung von Klasse 1 Protein in von Klasse 2 sHSPs gebildete HSG oder eine Erhöhung der Löslichkeit der Klasse 2 Proteine (Rückbildung von HSG) durch Expression mit Klasse 1 sHSPs wurde nicht beobachtet. Hefe basierte Interaktionsanalysen von sHSPs bestätigten, dass intra-Klassen Heterodimere (Heterodimere gebildet durch sHSP Monomere derselben Klasse) möglich waren. Heterodimere aus Monomeren der verschiedenen zytosolischen Klassen konnten nicht detektiert werden. Es wurden jedoch Interaktionen von *in vitro* vorliegenden quartären sHSP Strukturen unterschiedlicher Klassen beobachtet, wenn auch die genaue Stöchiometrie nicht näher definiert werden konnte. Interagierende sHSPs

zeigen keine Änderung der Sekundärstrukturen der einzelnen Interaktionspartner. Die für sHSPs der Klasse 1 typische temperaturinduzierte Dissoziation der quartären Struktur (Oligomere), wie auch die für eukaryotische Organismen typische Anzahl an Untereinheiten (12 Monomere) wurde nur für einige der untersuchten sHSPs beobachtet.

Die vergleichend untersuchten sHSPs zeigten trotz der vielfältigen beobachteten Interaktionen, dem unterschiedlichen zytoplasmischen Verteilungsmuster, sowie den sehr heterogenen quartären Strukturen, die gleiche Funktion. Das Resultat des beobachteten Schutzmechanismus war bei allen sHSPs unabhängig vom getesteten Klienten (Malatdehydrogenase oder CPH1Δ2) gleich, wenn auch der Klient bei der Klient / sHSP-Komplex Bildung, je nach getesteten sHSP unterschiedlich effizient gebunden wurde. Spezifität für nur eines der beiden getesteten Klienten wurde nicht beobachtet. Unter denaturierenden Bedingungen an sHSPs gebundene Klienten blieben löslich, waren aber nicht funktionell. Diese gebildeten Klient / sHSP-Komplexe waren bei RT stabil und dissoziierten nicht von alleine. Trotz der beobachteten Vielfalt der verschiedenen untersuchten strukturellen Aspekte scheint ein allgemeiner Mechanismus innerhalb dieser sHSP Klassen zu existieren, der es diesen ermöglicht fast jedes beliebige denaturierende Peptid zu erkennen und zu schützen.



# 1 Einleitung

Schon 1930 definierte Hans Selye das allgemeine Stresskonzept mit einem physiologischen Bereich von Belastung (Eustress) und einem Bereich mit übermäßiger Belastung (Dystress). Dystress kann zu dauerhaften Schäden und oder Krankheiten führen (Selye, 1975). Im Falle von höheren pflanzlichen Organismen, wie den für die Ernährung wichtigen Kulturpflanzen, manifestiert sich eine übermäßige Belastung in der erheblichen Verminderung des Pflanzenwachstums, wie auch bei der Blüten- und Samenbildung. Dies kann zu hohen Ertragsverlusten führen (Herbert, 2002).

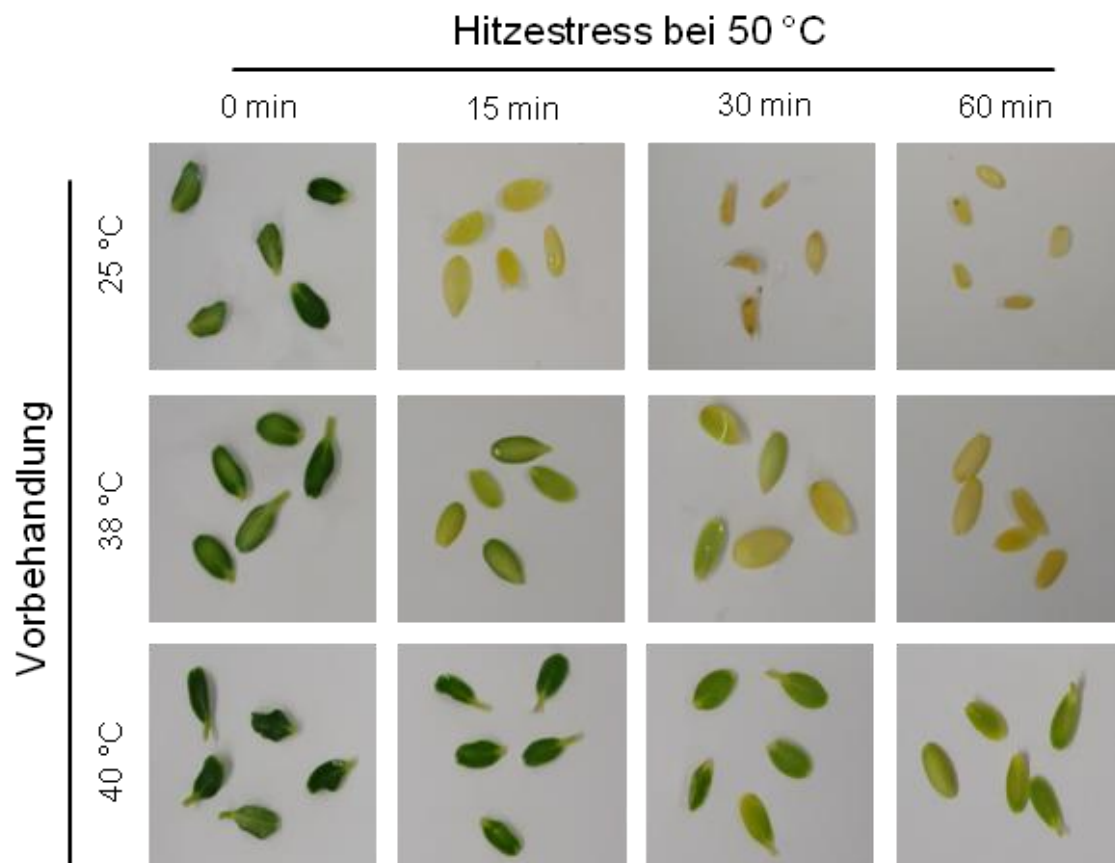


Abbildung 1: Akklimatisierungsreaktion (Härtung) am Beispiel der Thermotoleranz von Gurkenkeimlingen

Gurkenkeimlinge wurden 5 - 7 Tage im Dunkeln bei 25 °C angezogen. Die etiolierten Keimlinge wurden einer Vorbehandlung bei angezeigter Temperatur für 90 min unterzogen und nach 30 min bei 25 °C einem Hitzestress bei 50 °C für entweder 15, 30 oder 60 min ausgesetzt, dann einen Tag im Licht inkubiert. Der Grad der De-Etiolierung dient als Indikator für erworbene Thermotoleranz. Mit höheren Temperaturen vorbehandelte Keimlinge zeigten stärkere Ergrünung, da sie akklimatisiert waren.

Im Bereich des Eustress können Pflanzen durch schrittweise Vorbehandlung mit einem milden Stress abgehärtet werden (Härtung oder induzierte Stresstoleranz,

siehe Abbildung 1). Im Einklang mit dem von Selye entwickelten Stresskonzeptes sind sie dann in der Lage, auch stärkere bzw. andere Stressbelastungen ohne größere Schäden auszuhalten (Kapoor et al., 1990; Selye, 1998; Timperio et al., 2008). Weiterhin kann sich die Antwort auf einen Stressor in vielfältigen Anpassungen äußern (Selye, 1975). So führt in manchen Fällen eine Hitzevorbehandlung nicht nur zu einer erhöhten Toleranz gegenüber erneuter übermäßiger Wärmeeinwirkung, sondern auch zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Kälte oder Anoxie (Loreti et al., 2005). Neben verschiedenen thermisch induzierten zellulären Anpassungen (Raison et al., 1982), zeigten sich in Pflanzen eine erstaunliche Vielfalt an Hitze-induziert synthetisierten Proteinen, den sogenannten Hitzestressproteinen (Waters, 1995; Waters et al., 1996; Waters, 1999). Das Arabidopsis Genom beinhaltet ca. 19 sHSP Gene (Scharf et al., 2001; Siddique et al., 2008). Acht von diesen sHSPs wurden aufgrund von Sequenzstudien in zwei verschiedene zytosolisch lokalisierte Klassen eingeordnet. Ausgehend von einer Interaktionsanalyse wurde die Struktur und Funktion aller Mitglieder dieser zytosolischen Klassen (CI und CII) untersucht.

## 1.1 Die Familie der kleinen Hitzestressproteine

Hitzestressproteine werden bei erhöhten Temperaturen in verschiedenen Organismen synthetisiert (Ritossa, 1962). Die zuerst in Eukaryoten entdeckten Hitze induzierten Proteine wurden zunächst ohne Kenntnis ihrer Funktion, sondern nach dem beobachteten Phänotyp als Hitzestressproteine benannt und nach ihrem apparenten molekularen Gewicht in Familien sortiert (Li, 2004). In *Escherischia coli* (*E. coli*) wurden sHSP ähnliche Proteine zuerst in Proteinaggregatansammlungen (sogenannten „*inclusion bodies*“) assoziiert vorgefunden (Allen et al., 1992), daher die Nomenklatur Ibp A und Ibp B („*inclusion body associated protein*“). HSP-ähnliche, aber konstitutiv vorhandene Proteine wurden als „*heat shock cognates*“ (HSC) in die Nomenklatura eingeordnet (Sorger, 1987). HSP kommen in Bakterien (Mogk et al., 2003), einzellern (Haslbeck et al., 1999), Tieren, auch Menschen (Horwitz, 1992) und Pflanzen vor (Helm, 1989; Lauzon et al., 1990). In einem Netzwerk miteinander kooperierender Faktoren sind diese Proteine bei der Faltung, Assemblierung und

intrazellulären Verteilung von Proteinen behilflich und stabilisieren gegebenenfalls auch Intermediate der Faltung im Verlauf einer Stressperiode (Ellis, 1989). Diese begleitende Funktion wurde in der Molekularbiologie mit dem Begriff der „molekularen Gouvernante“ (*engl. Chaperone*) belegt (Ellis, 1989, 1996, 1999). Solche Chaperonnetzwerke existieren in fast allen Kompartimenten einer Zelle (Wang et al., 2004). Viele der molekularen Chaperone sind keine Faltungskatalysatoren, sondern können lediglich partiell gefaltete oder entfaltete Proteine binden und damit vor Aggregation bewahren. Zu letzteren gehören die in dieser Arbeit untersuchten Hitze induzierten sHSPs. Viele sHSPs agieren auf ATP unabhängige Weise, indem sie hydrophobe Aminosäuren partiell entfalteter und denaturierter thermosensitiver Substrate binden und diese so vor irreversibler Aggregation schützen (Horwitz, 1992; Basha et al., 2011).

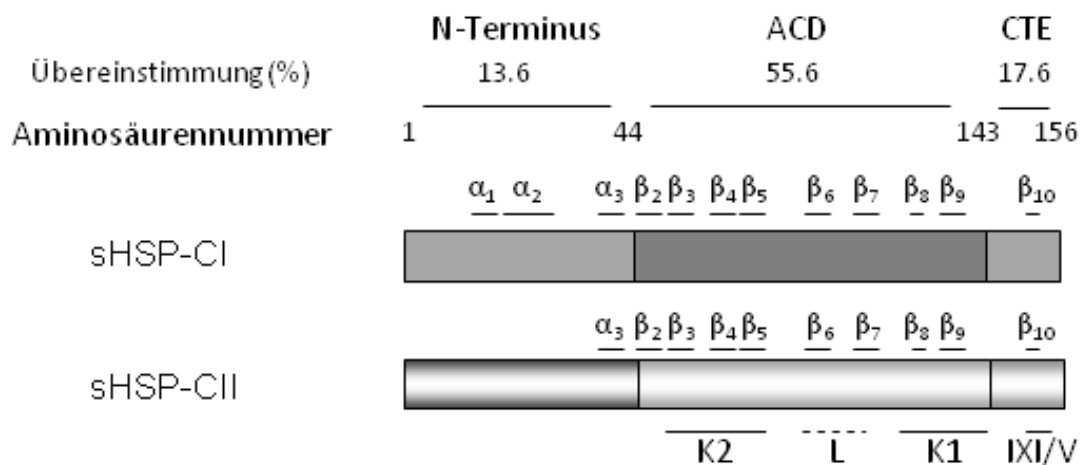


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Klasse 1 und Klasse 2 sHSPs

Pflanzliche zytosolisch lokalisierte sHSPs bestehen aus einem 40 - 45 AS langen N-Terminus, einer 90 - 100 AS langen  $\alpha$ -Kristalline Domäne (ACD), sowie einer kurzen C-terminalen Extension (CTE).  $\beta_2$  -  $\beta_{10}$  = Regionen mit vorhergesagten  $\beta$ -Faltblatt Sekundärstrukturen;  $\alpha_1$  -  $\alpha_3$  = Regionen mit vorhergesagten  $\alpha$ -Helix Sekundärstrukturen. Die schwarzen Balken innerhalb der ACD deuten schematisch die Positionen der beiden Konsensus Regionen (K2 und K1), sowie der trennenden Linker Region (L) von variabler Länge an. In der kurzen CTE befindet sich das stark konservierte IXI/V Motiv. Schema wurde nach (Basha et al., 2011) erstellt.

Charakteristische gemeinsame Einteilungsmerkmale der kleinen Hitzestressproteine sind ihr kleines monomeres Molekulargewicht (~15 - 40 kDa) und eine stark konservierte C-terminale Aminosäuresequenz von ~90 - 100 Aminosäuren (AS) Länge (K1 und K2, Abbildung 2). Diese Sequenz bildet ein charakteristisches Proteinstrukturmotiv aus, die  $\alpha$ -Kristalline Domäne (ACD). Sie ist ein gemeinsames Merkmal von allen sHSPs, sowie den  $\alpha$ -Kristallinen Proteinen in der Augenlinse von Vertebraten (de Jong et al., 1988; Plesofsky-Vig, 1992,; de Jong et al., 1993;

Caspers et al., 1995; Waters, 1995; Waters et al., 1996; de Jong et al., 1998). In Vertebraten übernimmt die für diese tertiäre Struktur namensgebende Proteinfamilie häufig weitere wichtige Funktionen, die für die Vitalität des Organismus eine entscheidende Rolle spielen können. So wird das  $\alpha$ -B-Kristallin des Menschen häufig bei neurologischen Krankheiten überexprimiert vorgefunden und Mutationen in  $\alpha$ -A- oder  $\alpha$ -B-Kristallin können grauen Star, aber auch Myopathien nach sich ziehen (Andley et al., 1996; Andley et al., 2002). In, durch Proteinaggregatansammlungen gekennzeichneten Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer Erkrankung (Renkawek et al., 1992; Shinohara et al., 1993; Renkawek et al., 1994), dem Creutzfeld-Jakob Syndrom (Renkawek et al., 1992), sowie der „*Alexander Disease*“ (Head et al., 1993), wurden häufig ACD-Proteine detektiert. Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Unterteilung der sHSP Familie in verschiedene Unterklassen war die subzelluläre Lokalisation des jeweiligen sHSPs (Waters et al., 1996; Scharf et al., 2001; Siddique et al., 2008).

**Tabelle 1: Liste aller in dieser Arbeit untersuchten sHSPs aus *A. thaliana* nach (Scharf et al., 2001)**

Nr.:	Name: (vorheriger Name)	AS:	MW (kDa):	Accession number (Gen)	Referenz:
1	At17.4-CI	156	17.4	At3g46230	(Takahashi, 1989)
2	At17.6A-CI	155	17.6	At1g59860	(Scharf et al., 2001)
3	At17.6B-CI	153	17.6	At2g29500	(Scharf et al., 2001)
4	At17.6C-CI (17.6)	157	17.6	At1g53540	(Helm, 1989)
5	At17.8-CI	157	17.8	At1g07400	(Scharf et al., 2001)
6	At18.1-CI (18.2)	161	18.1	At5g59720	(Takahashi, 1989)
7	At17.6-CII (Hsp17.6-II)	155	17.6	At5g12020	(Bartling et al., 1992)
8	At17.7-CII (Hsp17.6A)	156	17.7	At5g12030	(Scharf et al., 2001)

In Pflanzen wurden die jeweiligen sHSPs in die beiden Hauptunterklassen zytosolischer und Organell-assoziiierter sHSPs unterteilt. Durch weitergehende Unterteilungen entstanden die zytosolischen Klassen CI-CVII (C = Zytosolisch lokalisiert) und die organellaren Klassen P, MI, MII, Po, ER (P = Plastiden-, M =

Mitochondrien-, Po = Peroxisom-, ER = Endoplasmatisches Retikulum-lokalisiert). In dieser Arbeit wurden die Mitglieder der zytosolischen sHSP Klassen CI und CII untersucht (siehe Tabelle 1 und Abbildung 3).

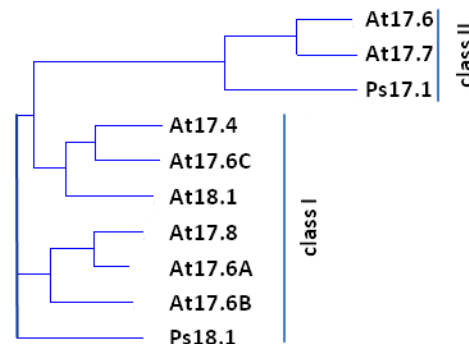


Abbildung 3: Verwandtschaft der zytosolischen sHSPs aus Arabidopsis

Reihenfolge wurde erstellt anhand der Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz mit Hilfe von Vector NTI®. At = *Arabidopsis thaliana*, Ps = *Pisum sativum*.

Die Klasse CI ist die größte Unterklasse und enthält sechs Mitglieder (17.4 / 17.6A-C / 17.8 / 18.1), Klasse CII enthält zwei Mitglieder (17.6 / 17.7). Wichtige Gemeinsamkeiten lassen sich nicht nur in der konservierten DNA-Sequenz der kodierenden Region, sondern auch in der 5'-untranslatierten Region finden. Dort befinden sich typische Regulationselemente wie das konservierte HSE (Heat Shock Element), eine typische Promotorregion Hitze-induzierter Gene (Pelham, 1982; Pelham, 1982; Ayme et al., 1985). Das HSE ist vergleichbar mit der TATA-Box von Haushaltsgenen und besteht ebenfalls aus einer typischen Konsensus Sequenz, welche aus konservierten palindromisch angeordneten Motiven besteht (Treuter et al., 1993). Diese HSE können bei Hitzestress spezifisch durch sogenannte HSF (Heat Shock Transkriptionsfaktoren) erkannt und reguliert werden (Sorgner et al., 1987; Clos et al., 1990). Zurzeit sind allein innerhalb der Arabidopsis Familie 21 verschiedene HSFs bekannt (Nover et al., 1996; Nover, 1997; Nover et al., 2001; Kotak et al., 2007). Neben Hitze, können auch osmotischer und oxydativer Stress, sowie Verwundungsstress die Transkription verschiedener sHSPs auslösen (Swindell et al., 2007). Weiterhin wurden bei verschiedenen Entwicklungsstadien, wie Blüten- und Samenreife, ebenfalls eine Akkumulation von kleinen Hitzestressproteinen beobachtet (Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer, 2000). Das Phänomen der entwicklungsspezifischen Akkumulation von kleinen Hitzestressproteinen wurde bisher am besten für die Samenreife charakterisiert. Besonders stark wurde die Gentranskription von At17.4-CI und At17.7-CII mit zunehmender Samenreife

induziert. Es konnte HsfA9 als ein dafür verantwortlicher entwicklungsspezifischer Transkriptionsfaktor, identifiziert werden, welcher gleichzeitig auch die HSP101 Transkription regulierte (Kotak et al., 2007). Obwohl nur zwei sHSPs, je eins der Klasse 1 und eins der Klasse 2, unter Hitzestressbedingungen bis zu 1 % der Gesamtproteinmenge (bei *P. sativum*) ausmachen können (Helm et al., 1997), zeigten die meisten bisher nachgewiesenen sHSP *loss-of-function* Mutationen, keine schweren Einschränkungen in der Pflanzenentwicklung oder Thermotoleranz. Die erhaltenen Phänotypen unterschieden sich kaum vom entsprechenden Wildtyp. Eine Ausnahme war eine heterozygote At17.4-CI / At17.6A-CI *A. thaliana* Doppelmutante mit einer erhöhten Embryoletalität (Dafny-Yelin et al., 2008). Für die erworbene Thermotoleranz wurde bisher nur für hochmolekulare Hitzestressproteine eine essentielle Rolle nachgewiesen (Hong, 2000; Queitsch et al., 2000), so dass die allgemeine physiologische Relevanz dieses sehr ausgedehnten zytosolischen Chaperonsystems schwer zu definieren war. Neuere Studien zeigten als zusätzliche Funktion, dass At17.8-CI innerhalb des Hitzestress unabhängigen Proteinrelokalisationsprozesses zwischen Zytosol und äußerer Chloroplastenmembran involviert sein könnte, indem es die Effektivität dieses Prozesses deutlich erhöhte (Kim et al., 2011). Daher ist davon auszugehen, dass die sHSPs mehr Funktionen besitzen, als die, die allein hitzeregulierten und nur bei Hitzestress funktionierenden Chaperone. Jedoch sind die Erkenntnisse über die sHSP Funktion bei nicht Stress bedingten Ereignissen sehr gering, da sie lange Jahre nicht im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen standen.

## **1.2 Struktur und molekulare Funktion von kleinen Hitzestressproteinen**

Kleine Hitzestressproteine werden aufgrund ihrer Übereinstimmungen innerhalb der  $\alpha$ -Kristallinen Domäne, sowie ihrer subzellulären Lokalisation in verschiedene Untergruppen eingeteilt (Waters, 1995; Waters et al., 1996; Scharf et al., 1998; Scharf et al., 2001; Poulain et al.). Die stark konservierte ACD wird flankiert von einem variablen, nicht konservierten N-terminalen Arm, sowie einer kurzen C-

terminalen Extension. *In vivo* und *in vitro* wurden sHSPs als einfache Dimere bis zu größeren Oligomeren mit 9 bis >30 Untereinheiten, abhängig vom Typ des sHSP, vorgefunden (Kim et al., 1998; Van Montfort et al., 2001; Stamler et al., 2005). Diese Oligomere können eine Masse von ~200 - 600 kDa erreichen.

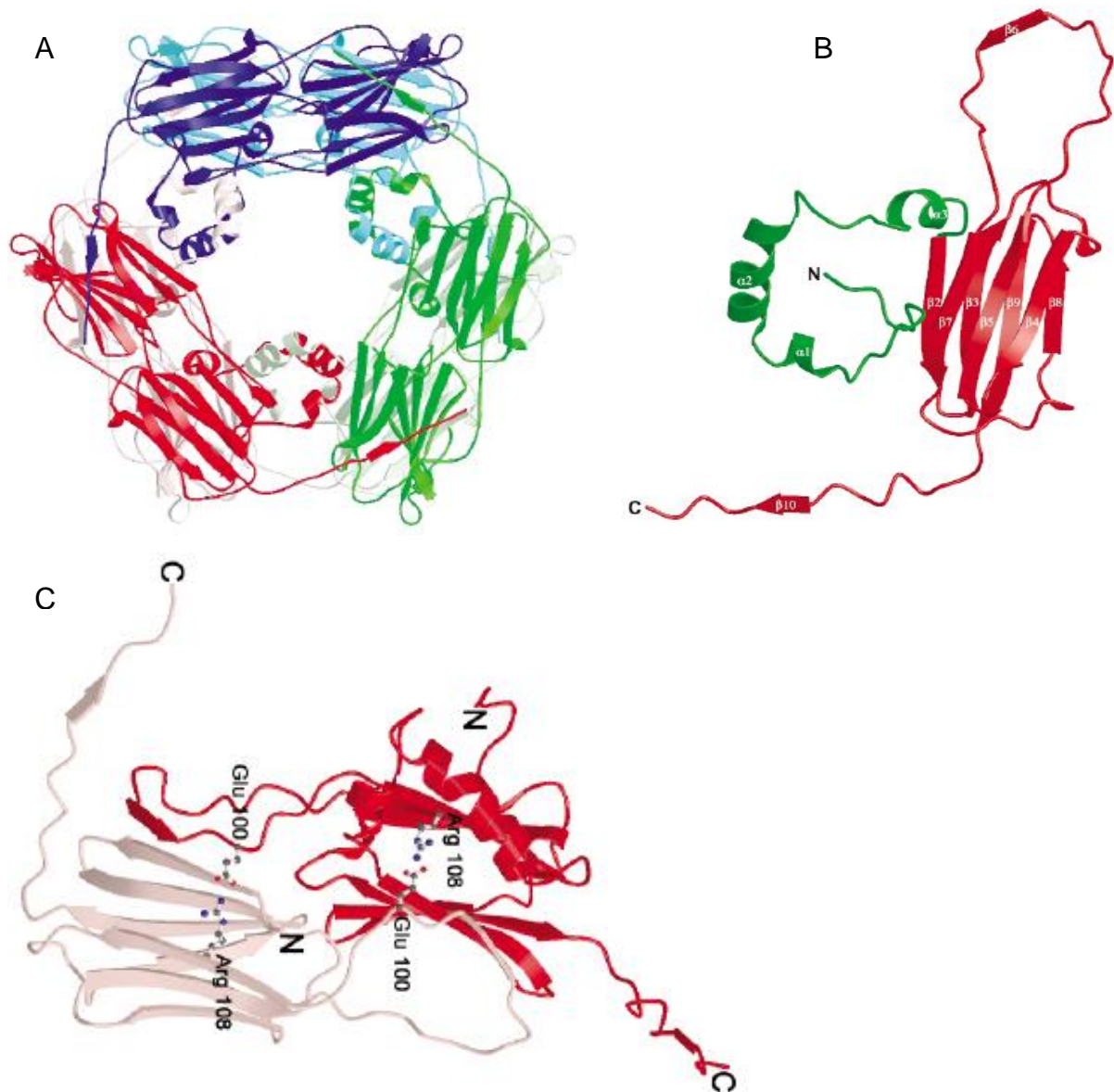


Abbildung 4: Kristallstruktur des kleinen Hitzestressproteins HSP16.9 aus Weizen (pdb ID: 1GME)

Dargestellt sind die Struktur sowie die daraus abgeleiteten Computermodelle des *Triticum Aestivum* HSP16.9. Zu sehen sind die verschiedenen Assemblierungsstadien von einem einfachen Monomer (B), über einen Dimer (C) bis zu einem Dodekamer aus 6 Dimeruntereinheiten (A). Bei dem gezeigten Dodekamer (A) wurden jeweils die Dimer-Bausteine in der gleichen Farbe dargestellt. In der gezeigten Monomerstruktur (B) wurde die ACD, sowie die C-terminale Verlängerung in rot und die N-terminale Verlängerung in grün dargestellt. Bei dem dargestellten Dimer (C) wurden die einzelnen Monomere in verschiedenen Farben dargestellt (rot und blass lila). Es wurden die Orte der möglichen Salzbrückenbildung gesondert hervorgehoben (van Montfort et al., 2001).

Erhaltene Strukturen von HSP16.5 (*Methanococcus jannaschii*), einem prokaryotischen Oligomer mit 24 Untereinheiten, sowie HSP16.9 (*Triticum Aestivum*), einem eukaryotischen Oligomer mit 12 Untereinheiten (s. Abbildung 4), zeigten Gemeinsamkeiten (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001). In beiden Oligomeren sitzt die größte Interaktionsschnittstelle in den kleinen Untereinheiten, den Homodimeren (Van Montfort et al., 2001; Sun, 2005). Diese lagern sich zu Oligomeren zusammen, welche durch hydrophobe Interaktion der C-terminalen Extension der einen Untereinheit mit der hydrophoben Grube in der ACD der anderen Dimeruntereinheit stabilisiert werden. Deletionen im Bereich des N- bzw. C-Terminus führten zu Änderungen im Oligomerisierungsverhalten bzw. der Chaperonaktivität der betroffenen sHSPs (Takemoto et al., 1993; Smulders et al., 1995; Bova et al., 1999; Kumar et al., 1999). Neben der für viele Hitzestressproteine beschriebenen Oligomerbildung war die Entstehung zytosolischer HSG ein charakteristisches Merkmal pflanzlicher sHSP (Nover et al., 1983). Während andauernden Temperaturstresses konnte die Bildung dieser HSG beobachtet werden, welche aufgrund ihrer Größe auch als 40 nm Partikel bezeichnet wurden. Ihnen wurde eine Speicherfunktion zugeschrieben, in dem wichtige Produkte bis zur Erholungsphase geschützt vorliegen können (Nover et al., 1989; Scharf et al., 1998; Weber et al., 2008). Durchgeführte Interaktionsstudien mit zytosolischen Hitzestressproteinen der Klassen 1 und 2 aus Tomaten und Erbsen deuteten darauf hin, dass die Assemblierung von HSG in mehreren Stufen aus den vorher gebildeten Oligomeren erfolgte (Kirschner et al., 2000). Dabei wurden drei Interaktionsebenen zwischen den Hitzestressproteinen der Klasse 1 und 2 vorgeschlagen. Zuerst führt die Interaktionen zwischen der  $\alpha$ -Kristallinen Domäne zweier Untereinheiten zu einer Dimerisierung (Sun, 2005; Franz Narberhaus, 2008; Haslbeck et al., 2008). Der zweite Schritt, die Assemblierung in oligomere Strukturen (z.B. Dodekamere) war abhängig von den jeweiligen N- und C-terminalen „Auswüchsen“ der  $\alpha$ -Kristallinen Domäne. Neben den oligomeren Strukturen der einzelnen zytosolischen sHSPs bilden manche von diesen eine dritte Struktur. Die C-terminale Domäne von Klasse 2 Hitzestressproteinen, sowie die Fähigkeit oligomere Strukturen bilden zu können, scheinen Voraussetzung für die thermal aktivierte Assemblierung solcher HSG zu sein. sHSPs der Klasse 1 könnten möglicherweise durch sHSPs der Klasse 2 in die entstehenden Komplexe rekrutiert werden (Kirschner et al., 2000).



sHSPs zeigen sich als dynamische Gebilde und scheinen Schnittstellen zwischen anderen Chaperonsystemen zu bilden. So konnte in einigen Fällen bei erhöhten Temperaturen eine Dissoziation oligomerer sHSPs in Dimere beobachtet werden. Diese Dimere interagieren scheinbar mit denaturierenden Proteinen und reassemblieren in größere definierte sHSP-Klient-Komplexe (Stromer et al., 2003; Basha et al., 2006). Viele Experimente haben gezeigt, dass sHSPs und  $\alpha$ -Kristalline Proteine eine große Bindungskapazität für eine Vielzahl von Hitze- sowie chemisch denaturierten Substraten (Klienten) besitzen und diese dadurch vor Aggregation bewahren können. Zur Untersuchung der Chaperonaktivität wurden häufig exemplarisch gewählte Proteine wie Karboanhydrase, Malatdehydrogenase oder Leuchtkäfer Luziferase eingesetzt (Rao et al., 1993; Forreiter et al., 1997; Torok et al., 2001). Die Neu- oder Rückfaltung der durch sHSPs im faltungskompetenten Zustand gehaltenen Proteine wurde über ATP abhängige Systeme gewährleistet die unter anderem Mitglieder der HSP70 Isoenzymfamilie mit einschließen könnten (Ehrnsperger et al., 1997; Forreiter et al., 1997; Lee, 2000; Polier et al., 2008). Für den Einfluss anderer hochmolekularer Chaperonsysteme (HSP90 sowie HSP100) auf die Neufaltung denaturierter Proteine, und deren Rolle bei der Erholung des Organismus von einer Hitzestressperiode, wurden ebenfalls Hinweise gefunden (Schirmer et al., 1994; Ludwig-Muller et al., 2000; Lee et al., 2005). Es wurde in *in vivo* und *in vitro* Studien nachgewiesen, dass eine Rückfaltung von exemplarisch denaturierten Proteinen durch hochmolekulare Chaperone effizienter war, wenn sHSPs anwesend waren (Kampinga et al., 1995). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern verschiedene Mitglieder der zytosolischen Klassen 1 und 2 aus Arabidopsis sich in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. Neben den molekularen Eigenschaften wurden Interaktionsmöglichkeiten innerhalb einer und auch zwischen den verschiedenen untersuchten Klassen getestet. Ein kooperativer Klientenschutz von verschiedenen zusammen getesteten sHSPs wurde bisher noch nicht beschrieben, sondern nur ein additiver Effekt (Tripp et al., 2009), so dass dieser Aspekt in dieser Arbeit nicht aufgegriffen wurde.

### 1.3 Ein neuer sHSP Klient: Das Phytochrom CPH1 $\Delta$ 2

In bisherigen sHSP Funktionsanalysen wurde ein breites Spektrum an verschiedenen Proteinen (Klienten) getestet, welche durch sHSP Zugabe vor temperaturinduzierter irreversibler Aggregation geschützt werden sollten. Einige, Malatdehydrogenase (MDH), Luziferase (LUC) und Zitratsynthase (CS), hatten sich unter Beachtung verschiedener Parameter (Preis, Handhabung, Reproduzierbarkeit und Quantifizierungsmöglichkeiten) als wesentlich nützlicher erwiesen als andere. Obwohl einige der verwendeten Klienten meist tierischen Ursprungs waren (z. B. MDH oder CS gewonnen aus Schweineherzen) wurden diese unabhängig der Herkunft der untersuchten sHSPs verwendet (Forreiter et al., 1997; Lee et al., 1997; Jaya et al., 2009). Weiterhin waren die meisten verwendeten Klienten Enzyme, dadurch wurden Kofaktoren für die Messung der Enzymaktivität benötigt. Parallel zu den vergleichenden Untersuchungen der Klasse 1 und 2 sHSPs wurde ein Klient gesucht, dessen Funktionalität sich einfach, ohne Kofaktoren, quantifizieren lässt. Zudem sollte dieser Klient einem pflanzlichen Protein sehr ähnlich und in großen Mengen reproduzierbar herstellbar sein. Da keine Kofaktoren zugegeben werden sollten, wurde die intrinsischen Nachweismöglichkeiten von lichtabsorbierenden Molekülen genutzt. Durch die bereits sehr gut dokumentierte Fotokonversion der bereits seit langer Zeit untersuchten Phytochrome deuteten sich vielversprechende Analysemöglichkeiten an (Quail et al., 1986; Quail et al., 1994; Furuya, 1996). Phytochrome können nicht nur Licht absorbieren, sondern sie reagieren mit spezifisch nachweisbaren innermolekularen strukturellen Umlagerungen in Antwort auf bestimmte Lichtqualitäten im Rotlichtbereich (Hunt, 1981; Remberg et al., 1997). Phytochrome sind pflanzliche Fotorezeptoren, die unter anderem in verschiedene Entwicklungsprozesse wie Samenkeimung oder Ergrünung involviert sind und entscheidende Schlüsselpositionen des pflanzlichen Lebenszyklus regulieren (Devlin et al., 1998; Whitelam et al., 1998; Correll, 2005). Bisher in verschiedensten Organismen nachgewiesene Phytochrome konnten in zwei allgemeine Funktionsabschnitte (siehe Abbildung 5), der Sensor und der Transmitter-Domäne unterteilt werden (Rockwell et al., 2006). Die Expression von pflanzlichen Phytochromen im standardisierten prokaryotischen Expressionssystem ist nicht möglich.

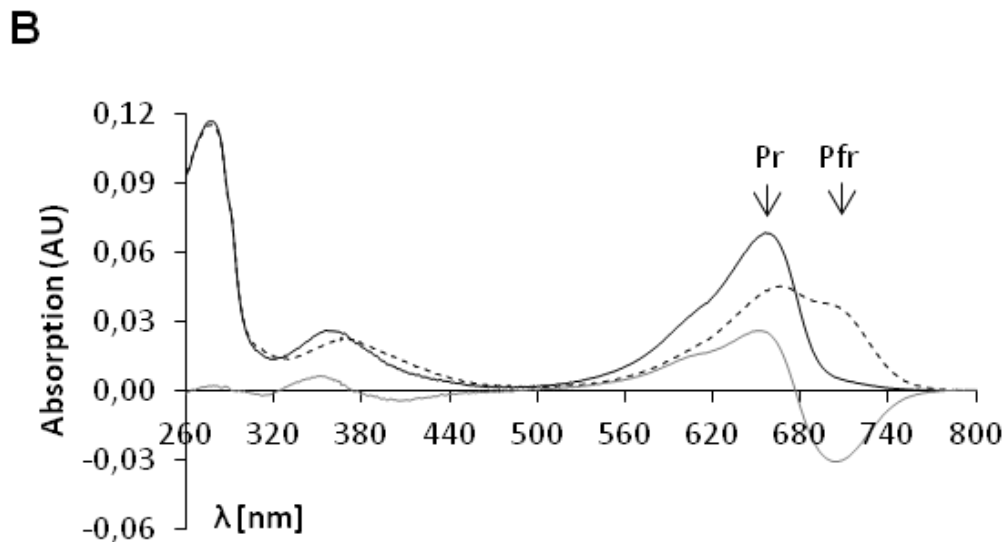
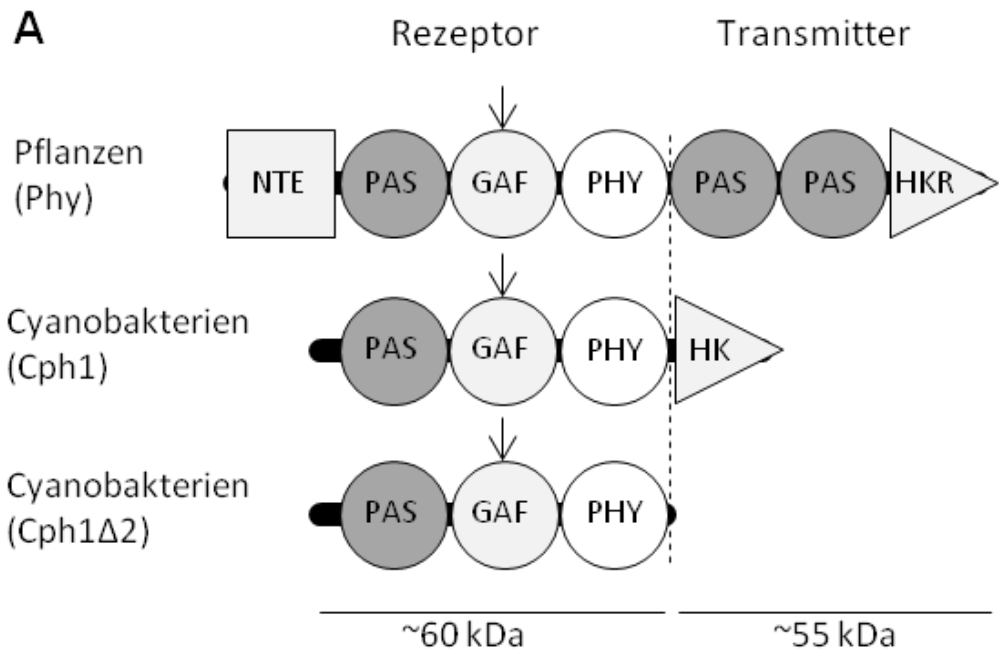


Abbildung 5: Schematische Struktur und Absorptionseigenschaften von Phytochromen

(A) Schematische Domänenstrukturierung. Allen Phytochromen ist ein Rezeptor aus einer PAS (manchmal auch PAS like domain genannt), GAF und PHY Domäne und ein Transmitter mit einer Histidin Kinase (HK) gemein. Lediglich pflanzliche Phytochrome besitzen zusätzlich eine spezifische N-Terminale Extension (NTE), sowie zwei zusätzliche PAS Domänen im C-Terminus. Diese sitzen vor einer Histidin Kinase ähnlichen Domäne (HKR) der ein typisches Phosphor akzeptierendes Histidin und weitere His-Kinase typische Sequenzen fehlen. Die Chromophorbindestellen wurden mit einem Pfeil markiert. Cyanobakterien nutzen in der Regel Phycocyanobilin und höhere Pflanzen Phytychromobilin. Die ungefähren molekularen Gewichte der markierten monomeren Teilabschnitte wurden angegeben. Die Abbildung wurde adaptiert nach (Sharrock, 2008) und (Montgomery, 2002). (B) Darstellung eines typischen Absorptionsspektrums eines Phytochroms (hier CPH1Δ2). Nach dunkel-rot (Far Red) Bestrahlung (schwarze Linie) waren alle Moleküle in der Pr Konformation. Nach hell-rot (Red) Bestrahlung (schwarze gestrichelte Linie) war ein Zuwachs der Absorption bei ~710 nm (Pfr) zu beobachten. Das kalkulierte Differenzspektrum (Pr – Pfr; graue Linie) verdeutlichte den Anteil der fotokonvertierenden Moleküle. Die verschiedenen absorbierenden Molekülvarianten wurden mit Pfeilen markiert.

Die Entdeckung eines Phytochroms in fotosynthetisch aktiven Cyanobakterien (CPH1) war von großer Bedeutung diese Ertragsproblematik zu beseitigen. Das Sensormodul von CPH1 (CPH1Δ2) lässt sich problemlos in großer Menge mit seinem

Chromophor in prokaryotischen Zellen exprimieren und leicht daraus reinigen (Lamparter et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Landgraf et al., 2001). Es besitzt große Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Phytochromen, assembliert *in vivo* zum Holoprotein und wurde bereits für extensive Struktur- und Funktionsstudien verwendet (Hubschmann et al., 2001). Die Sensordomäne wurde als ein neuer Klient für Chaperon Funktionsanalysen ausgewählt und exemplarisch mit einigen sHSPs (At17.6B-CI und At17.8-CI) im Vergleich zu dem „bewährten“ Klient MDH getestet. Dieser Teil der vergleichenden Klienten Protektionsanalyse mit zwei verschiedenen sHSPs aus Klasse 1, sowie die daraus abgeleiteten Erkenntnisse wurden bereits publiziert (Eisenhardt, 2012).

## **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Da vor allem in Pflanzen sehr viele verschiedene sHSPs existieren, war eine vergleichende Analyse der molekularen Struktur und Funktion das vorrangige Ziel dieser Arbeit. Nach Feststellung der intrazellulären Lokalisation der zu untersuchenden Proteine, sollten die bei Hitzestress parallel vorliegenden sHSPs untersucht werden, ob diese auf verschiedenen, für Proteine definierbaren Ebenen (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur), interagieren können. Es sollte auch untersucht werden, welche Struktur die untersuchten sHSPs hatten. Neben einer Strukturanalyse bei verschiedenen Temperaturen sollte die Funktion der zu untersuchenden Proteine in vergleichender Weise dokumentiert werden. Hier standen Fragen zu der Interaktion zwischen sHSP und Klient im Vordergrund. Dafür sollten verschiedenste Klientenproteine untersucht werden, wobei ein neuer Klient (CPH1 $\Delta$ 2) für vergleichende und tiefer gehende Analysen etabliert werden sollte. Ergänzend sollte getestet werden, welchen Einfluss der klassenspezifische N-Terminus auf die Struktur und Funktion hatte. Dabei sollten exemplarische N-terminale Deletionen zum Vergleich erstellt werden. In einem Fall sollte der Klasse 2 N-Terminus an eine Klasse 1 N-terminale Deletion fusioniert werden. Diese künstliche „inter-Klassen“ Chimäre diente der vergleichenden Analyse möglicher klassenspezifischer Eigenschaften wie HSG Bildung oder Oligomerdissoziation.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Software

Alle zu dieser Arbeit angefertigten Tabellen und Grafiken wurden mit den Computerprogrammen Microsoft® Excel 2007, Microsoft® Word 2007, GNU *Image Manipulation Programme* (GIMP 2.6.8) und Microsoft® PowerPoint® 2007 erstellt. Weiterhin wurden Vector NTI® (Version 9.1.0) von Invitrogen, sowie Quantity One (Version 4.6.3) von BioRAD verwendet.

#### 2.1.2 Verwendete Präparations- / Reinigungskits und Säulen

In Tabelle 2 sind die im Zuge dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen *Kits* dargestellt. In den gelieferten Gesamtpaketen inbegriffene Lösungen, Enzyme oder Medien wurden nicht gesondert gelistet.

**Tabelle 2: Präparations-Kits**

Produkt:	Hersteller:
<i>Superscript Preamplification System</i>	Gibco BRL
<i>DNA Isolation Spin-Kit Agarose</i>	AppliChem
<i>Matchmaker™ Two-Hybrid System 3</i>	Clontech
<i>DNA Enzyme-free Isolation Spin-Kit</i>	AppliChem
<i>Plas/mini Isolation Spin-Kit</i>	AppliChem
DEAE Sepharose Medium	Pharmacia Bioscience
Hydroxyapatit	BioRAD
Ni-Nta Agarose	GE Healthcare
Superdex200 10/30	GE Healthcare
TEV-Protease	Promega

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3 zeigt zunächst alle kommerziell erworbenen Puffer und Stammlösungen, während Tabelle 4 alle nicht kommerziell erworbenen Puffer und Lösungen dargestellt sind.

**Tabelle 3: Kommerziell erworbene Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller
Antarctic Phosphatase Buffer	NEB
NEB Buffer 2	NEB
NEB Buffer 3	NEB
NEB Buffer EcoRI	NEB
T4-DNA-Ligase Buffer	NEB
<i>Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)</i>	TAKARA Bio Inc.

**Tabelle 4: Nicht kommerziell erworbene Puffer und Lösungen**

Bezeichnung:	Zusammensetzung:	Weitere Angaben:
10x MOPS buffer	Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 0.2 M, Natriumacetat 50 mM, EDTA 5 mM, im Dunkeln bei 4°C lagern, Auffüllen auf 1 l mit autoklavierten DEPC behandelten H <sub>2</sub> O	autoklaviert
Adeninhemisulfatlösung	0.2% (w/v) Adeninhemisulfat in H <sub>2</sub> O	steril filtriert
Ampizillin-Lösung	10% (w/v) Ampizillin in H <sub>2</sub> O	steril filtriert
KAc. Sol. III	60% (v/v) 5 M KAc, 11.5% (v/v) Eisessig, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	-
Kanamyzin-Lösung	5% (w/v) Kanamyzin in H <sub>2</sub> O	steril filtriert

**Tabelle 4: Nicht kommerziell erworbene Puffer und Lösungen (Fortsetzung)**

Bezeichnung:	Zusammensetzung:	Weitere Angaben:
Ladepuffer Agarose 10x	0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylen Cyanol FF, 30% (v/v) Glycerin in H <sub>2</sub> O, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	-
ONPG Lösung	Lösen von 4 mg/ml ONPG in Z-Puffer, pH 7.0 einstellen und 1-2 h schütteln	-
PCR-III-Puffer 10x	500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% (v/v) Triton-X100, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	-
PEG/LiAc-Lösung	80% (v/v) 50%iges (w/v) PEG3350, 10% (v/v) 1 M LiAc, 10% (v/v) 10x TE, pH 7.5	autoklaviert
RNA 3x Ladepuffer	10 µl Formamid, 2,5 µl Formaldehyd (37%), 2 µl 10x MOPS Puffer, 0,5 µl EtBr	-
TBE-Puffer 5x	0.5 M Tris, 0.42 M Borsäure, 50 mM EDTA, auffüllen mit H <sub>2</sub> O, pH 8.0	Autoklaviert
TENS	0.1 M NaOH, 0.5% SDS, auffüllen mit TE (1x)	frisch angesetzt
TE-Puffer 10x	0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA	Autoklaviert
Z Puffer	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 45 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 10 mM KCL, 1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, Auffüllen mit H <sub>2</sub> O, pH 7.0	Autoklaviert
0,1 M Phosphatpuffer	Wie in (Sambrook, 2006) beschrieben angesetzt	steril filtriert
Waschpuffer HiTRAP	250 mM NaCl, 50 mM Phosphatpuffer pH 7.8, 10 – 100 mM Imidazol	steril filtriert
Elutionpuffer HiTRAP	250 mM NaCl, 50 mM Phosphatpuffer pH 6.8, 100 - 500 mM Imidazol	steril filtriert
TESβ-Puffer	NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM β-Mercaptoethanol	steril filtriert

## 2.1.4 Nähr- bzw. Anzuchtmedien

Während in Tabelle 5 alle kommerziell erworbenen Nährmedienzusätze aufgeführt sind, sind in Tabelle 6 alle nicht kommerziell erworbenen Nährmedien gelistet.

**Tabelle 5: Kommerziell erworbene Nährmedienzusätze**

Bezeichnung	Hersteller	Nährmediumzusätze
SD / -Leu	Clontech	-Leu DO Supplement
SD / -Trp	Clontech	-Trp DO Supplement
DD	Clontech	-Leu/ -Trp DO Supplement
TD	Clontech	-His/-Leu/-Trp DO Supplement
QD	Clontech	-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement

Das Bacto™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids Grundprodukt (Bezugsfirma DIFCO) wurde nach Herstellerangaben mit Nährstoffen angereichert und je nach Verwendungszweck als Fest- oder Flüssigmedium mit Agar versetzt oder nicht.

**Tabelle 6: Nicht kommerziell erworbene Nährmedien**

Bezeichnung:	Zusammensetzung:	Sonstige Angaben:
LB-Agar	1% w/v Agarose in LB-Medium	Autoklaviert
LB-Medium	1% w/v Bacto-Trypton, 1% w/v NaCl, 0.5% w/v Hefeextrakt, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	Autoklaviert
S.O.C.-Medium	2% w/v Bacto-Trypton, 0.5% w/v Hefeextrakt, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	Autoklaviert
YPDA-Agar	1% w/v Agarose in YPDA-Medium	Autoklaviert
YPDA-Medium	2% w/v Tryptopepton, 1% w/v Hefeextrakt, 2% w/v Glukose, 1.5% v/v 0,2%iges (w/v) Adeninhemisulfat*, pH 6.5, auffüllen mit H <sub>2</sub> O	Autoklaviert

\*Thermisch labile Bestandteile wurden steril filtriert (Adeninhemisulfat) und den thermisch stabilen, autoklavierten Bestandteilen zugefügt.



### 2.1.5 Lebendmaterial

Für die RNA Extraktion wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vom Ökotyp *Columbia* verwendet. Für *in vivo* Fluoreszenzanalysen wurden frische handelsübliche Zwiebelknollen (*Allium cepa*) verwendet. Zur Vervielfältigung der erstellten rekombinanten Plasmide wurde ausschließlich der *E. coli* Stamm Top10F' verwendet. Die kompetenten Zellen wurden von M. Bingel / A. Weisert zur Verfügung gestellt. Die Hefe 2-Hybrid Analyse wurde mit Hefen vom Stamm AH109 durchgeführt. AH109 ist ein von *PJ69-2A* abgeleiteter Hefestamm (James et al., 1996) und enthält u.a. die *HIS3*, *lacZ*, *MEL1* und *ADE2* Reportergene, welche im Hefegenom in verschiedenen Regionen, unter der Kontrolle verschiedener *GAL4* kontrollierter Promotoren, integriert vorliegen. Die  $_{His6}$ SHSPs und deren Modifikationen wurden im *E. coli* Stamm BL21 exprimiert. Tabelle 7 listet die Genotypen der verwendeten Zellen auf.

**Tabelle 7: Lebendmaterial**

Gattung / Art	Stamm	Hersteller	Genotyp (den Herstellerangaben entnommen)
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	Top10F'	Invitrogen	F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) .Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1, araD139 Δ(ara-leu)7697 .galU galK rpsL endA1 nupG
<i>E. coli</i>	BL21	Invitrogen	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) araB::T7RNAP-tetA
<i>E. coli</i>	DH5α Turbo	NEB	F' proA+B+ lacI <sup>q</sup> Δ lacZ M15/ fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)Tet <sup>S</sup> endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	AH109	Clontech	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, .gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-.GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1

### 2.1.6 Enzyme und sonstige Proteine

In Tabelle 8 sind alle verwendeten Enzyme und Proteine aufgeführt.

**Tabelle 8: Enzym- / Proteinliste**

Enzym	Hersteller
EcoRI	NEB
HindIII	NEB
NcoI	NEB
NdeI	NEB
XhoI	NEB
XbaI	NEB
KpnI	NEB
NotI	NEB
Antarctic Phosphatase	NEB
<i>Taq</i> -Polymerase	Eigene Herstellung
T4-DNA-Ligase	NEB
<i>TaKaRa Ex Taq</i> <sup>TM</sup>	TAKARA Bio Inc.
Malatdehydrogenase	SERVA
<i>Horseradish peroxidase</i>	Merck
1 kBp DNA Marker	NEB
100 Bp DNA Marker	NEB
Myoglobin	Merck
Karboanhydrase	Merck
BSA	Merck / Sigma
Katalase	Merck
Ferritin	Merck
Thyroglobulin	Merck

## 2.1.7 Primer

Tabelle 9 zeigt im Lauf der Arbeit verwendete *Primer* auf. Weiterhin ist der Tabelle zu entnehmen welche *Primer*-Kombinationen zur Vervielfältigung der verschiedenen sHSP cDNAs eingesetzt wurden. Weiterhin ist die allgemeine Restriktionsenzym Bindeplattform (T)TGG, sowie die jeweilige Schnittstelle welche aus den nachfolgenden 6 aufgeführten Bp besteht, angegeben. Zur Einhaltung des Leserasters wurden falls nötig der *Forward Primer* mit zusätzlichen Basenpaaren (G) zwischen Schnittstelle und Startcodon versehen. Die erhaltenen cDNA Sequenzen wurden für die Rekombination in pGBKT7 verwendet. Nach Sequenzanalyse (Gatc Biotech AG, Konstanz, Germany) wurden mit diesen inserierten und verifizierten Sequenzen alle weiteren Rekombinationen in die Vektoren pGADT7, pET28 (a), pBADM-11 und pRT (YFP / CFP) durchgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete *Primer***

Funktion	Hersteller	Sequenz 5' - 3'
At17.6A Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGTCGCTGATTCCAAGCTTCTTCGGC
At17.6A Reverse Primer	Invitrogen	TGGGAATTCTTAGCCAGAGATATCAATAGACTTAACT
At17.6B Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGTCGATGATTCCAAGTTTCTTCA
At17.6B Reverse Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGTCGATGATTCCAAGTTTCTTCA
At17.6C Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGATGTCTCTAATTCCAAGCATCTTCGGA
At17.6C Reverse Primer	Invitrogen	TGGGAATTCTTAACCAGAGATATCAATGGACT
At17.4 Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGTCTCTAGTTCCGAGCTTTTTT
At17.4 Reverse Primer	Invitrogen	TGGCCATGGTTAACCAGAGATATCAACGGACTTG
At17.8 Forward Primer	Invitrogen	TGGCATATGATGTCGCTTATTCCAAGCTTCT
At17.8 Reverse Primer	Invitrogen	TGGGAATTCTTAGCCAGAGATATCAATAGACT
At18.1 Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGTCTCTCATTCCAAGCATTTTT
A18.1 Reverse Primer	Invitrogen	TGGGAATTCTCAATTAGCCCCGGAGATATC

**Tabelle 9: Verwendete Primer (Fortsetzung)**

Funktion	Hersteller	Sequenz 5' - 3'
At17.6 Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGGATTTAGGAAGGTTTCCAAT
At17.6 Reverse Primer	Invitrogen	TGGCCATGGTCAAGCAACTTGAACCTGAATT
At17.7 Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGATGGATTTGGAGTTTGAAGGT
At17.7 Reverse Primer	Invitrogen	TGGGAATTCTCAAGCGACTTGAACCTGTATA
At17.8 $\Delta$ N Forward Primer	Invitrogen	TGGCATATGGGCGATAACGAACGCAC
At17.6 $\Delta$ N Forward Primer	Invitrogen	TGGCCATGGGGCAATGGCTGCTAC
NPH3	Invitrogen	ATGGGGAATCTGAGAGCG
NPH3	Invitrogen	TTATGAAATTGAGTTCCT
NPH3 $\Delta$ N	Invitrogen	AGACTCCATCTTGGTCCTGAA
Lock-docking oligo (dT) Primer	Gibco BRL	GGGCTCGGCCTGACCGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTV*

\* V = alle Basen (C, G, A) außer T

## 2.1.8 Plasmide

Alle im Zuge dieser Arbeit gezeigten Hefe-Experimente wurden mit den beiden Plasmiden pGBKT7 und pGADT7 (Clontech) durchgeführt. Die in den *in vivo* Lokalisationsstudien verwendeten Fluoreszenzvektoren beruhen auf dem Plasmidgerüst der pRT-Serie (Topfer et al., 1987), welche durch Einfügen einer kodierenden Sequenz für ein *yellow fluorescent protein* (YFP) oder *cyan fluorescent protein* (CFP) vor die Klonierungsschnittstelle modifiziert wurden (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995). Durch Anfügen einer gewünschten cDNA Sequenz im richtigen Leseraster, lassen sich fluoreszierende Fusionsproteine in pflanzlichen Zellen unter Kontrolle eines 35s-Promotors exprimieren. Die Expression aller mit einem His-Epitop versehenen sHSPs der Klassen 1 und 2 erfolgten mit Hilfe des Expressionsplasmides pBADM-11. Exemplarische Analysen einzelner sHSPs ohne Epitop, erfolgten mit dem Expressionsplasmid pET28(a), welches mit NcoI / EcoRI geöffnet wurde. Dadurch wurde das N-terminale His-Epitop aus dem Plasmid

entfernt. Plasmidkarten mit den wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Vektoren wurden dem Anhang beigelegt.

## 2.1.9 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle wurden alle für die experimentellen Arbeiten benötigten Feststoff- und Flüssigchemikalien sowie deren Hersteller aufgelistet.

**Tabelle 10: Verwendete Chemikalien**

Bezeichnung:	Hersteller:
6-Aminopurin (Adeninhemisulfatsalz)	Sigma
Acrylamide 4K Solution (30%) Mix 37,5:1	Applichem
Agar Kobe I	AppliChem
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA
Ammoniumsulfat (AmS)	Applichem
Ampizillin	AppliChem
Arabinose	Roth
bis-ANS	Sigma
Borsäure	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Chloroform	AppliChem
Cyanol	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Eisessig	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Formaldehyd	AppliChem
Formamid	AppliChem

**Tabelle 10: Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)**

Bezeichnung:	Hersteller:
Glucose Monohydrat	AppliChem
Glycerol	AppliChem
Imidazol	Merck
IPTG	Appllichem
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem
KAc	AppliChem
Kanamycin	AppliChem
KCl	Merck
LiAc	AppliChem
Magnesiumsulfat	Merck
MgCl <sub>2</sub>	AppliChem
NaCl	AppliChem
NADPH	Sigma
NaOH	Roth / AppliChem
Natriumacetat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdodekylsulfat (SDS)	Appllichem
NBT / BCIP	Appllichem
o-Nitrophenylendiamin	Sigma
ONPG (2-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	AppliChem
Oxalacetat (Oxaloesigsäure)	Sigma
PEG3350	Sigma
Spermidine	Sigma
β-Mercaptoethanol	AppliChem
TEMED	Appllichem
Tricine	Sigma
Tris	AppliChem
Triton-X100	Roth
Trizol	AppliChem
Wasserstoffperoxid	Fluka
X-Gal	AppliChem
Xylen	Sigma

## 2.2 Methoden

Nach der Bestätigung der gleichen intrazellulären Lokalisation der zu untersuchenden Proteine, wurde eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Ausgehend von dieser war das Ziel der Arbeit eine umfassende und vergleichende Untersuchung der zytosolischen sHSPs der Klassen 1 und 2 aus *Arabidopsis* unter funktionalen und strukturellen Gesichtspunkten. Dabei standen Fragen zur nativen Struktur (Sekundär- und Quartärstruktur) bei verschiedenen Temperaturen, sowie die Analyse der Chaperonaktivität im Vordergrund.

### 2.2.1 Anzucht, Stressbehandlung und Ernte der *A. thaliana*

Für eine RNA Extraktion wurden *A. thaliana* vom Ökotyp Columbia verwendet. Die Pflanzen wurden in einer Kurz tags Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen mit 8 h Licht ( $30 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen. Temperatur lag bei 22 - 25 °C, die mittlere relative Luftfeuchte lag bei 55 %.

Zur Induktion der endogenen HSP-Expression wurden die 3 - 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen vor der Ernte folgender Hitzebehandlung in einem Brutschrank unterzogen: kurzer Hitzestress bei 41 °C für 15 min, 120 min Restitutionsphase bei 25 °C, erneuter Hitzestress bei 41 °C von 90 min (Kirschner et al., 2000). Die gesamten Pflanzen wurden mit VE-Wasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie ohne aufzutauen direkt für die RNA Extraktion weiterverwendet wurden.

### 2.2.2 Vervielfältigung der sHSP cDNA – Sequenzen

#### RNA Extraktion

Es wurde eine modifizierte Methode nach (Chirgwin et al., 1979) verwendet. 100 - 500 mg tiefgefrorenes Pflanzenmaterial von hitze- bzw. ungestressten Pflanzen

wurden in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser sehr fein zerrieben. Zu 1 ml Trizol wurden 100 mg zerriebenes Pflanzenmaterial gegeben. Nach 15 s vortexen wurde die Probe für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min zentrifugiert (50.000g, 4 °C). Der Überstand wurde nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach 15 s mischen erfolgte eine Inkubationszeit von 2 - 3 min bei RT, bevor erneut für 15 min zentrifugiert wurde (50.000g, 4 °C). In einem weiteren neuen Reaktionsgefäß wurde aus der überführten wässrigen Phase die darin enthaltene RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt (10 min bei RT), bevor erneut für 15 min zentrifugiert wurde (12.000g, 4°C). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min 12.000g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Heizblock getrocknet und abschließend in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst.

#### **Photometrische und gelelektrophoretische Analyse der Isolierten RNA**

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe eines Spektralphotometers gemessen. Von dem RNA Extrakt wurde ein Absorptionsspektrum (200 - 300 nm) aufgenommen. Mithilfe der Absorption bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration (mg / µl) bestimmt. Einer  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer Menge von 40 µg einzelsträngiger RNA. Für DNA sind es 50 µg. Nach der photometrischen Quantifizierung wurden die Proben in qualitativen denaturierenden RNA Gel analysiert. Dieses wurde nach der in (Sambrook, 2006) beschriebenen Methode präpariert. Die Proben wurden vor dem Laden in 3x RNA Ladepuffer bei 65°C für 5 min inkubiert.

#### **cDNA - Synthese**

Es wurde das *Superscript Preamplification System* (Gibco BRL) verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden für die cDNA Synthese je 5 µg der beiden RNA - Präparationen, Kontrolle (K) und hitzestress (HS), in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die erhaltene Gesamt cDNA wurde 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und bei – 20 °C gelagert.



### PCR vermittelte Vervielfältigung der sHSP cDNA Sequenzen

Es wurden für jedes sHSP spezifische *Primer* - Kombinationen (s. 2.1.7: *Primer* - Tabelle) verwendet, um die jeweiligen sHSP-cDNA Sequenzen aus den beiden erstellten Gesamt cDNAs (K und HS) mittels PCR zu vervielfältigen. Die einzelnen sHSP *Primer* - Sequenzen wurden mithilfe des im Internet verfügbaren *A. thaliana* Genoms ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) hergeleitet. Es wurden folgende *gene accession numbers* verwendet: At17.4-CI (At3g46230), At17.6A-CI (At1g59860), At17.6B-CI (At2g29500), At17.6C-CI (At1g53540), At17.8-CI (At1g07400), At18.1-CI (At5g59720), At17.6-CII (At5g12020), At17.7-CII (At5g12030). Wie in der Einleitung beschrieben, wurden die Klasseneinteilungen und jeweiligen *accession numbers* der Literatur entnommen (Scharf et al., 2001). Die hergeleiteten *Primer* wurden mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen und bei Bedarf mit Füllsequenzen zur Leserasterkorrektur versehen. In Tabelle 9 wurden alle für die Initiale Rekombination in den Ködervektor (pGBKT7) verwendeten *Primer*-Kombinationen (*forward* und *reverse Primer*) gelistet. Die Vervielfältigung der einzelnen sHSP-Gene erfolgte nach einem PCR-Standardprotokoll mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C, einer *Annealing* Temperatur bei 62 °C und einer DNA-Elongationsphase bei 72 °C (Helfman et al., 1987; Regan et al., 1994). Es wurden 30 Zyklen mit einer 1:500 verdünnten cDNA als Matrize verwendet. Es wurden jeweils 2 µl der erhaltenen Produkte zur qualitativen und quantitativen Analyse auf ein Agarosegel (1%) geladen, welches nach (Sambrook, 2006), präpariert wurde. Restliches Produkt wurde mit einem PCR - Reinigungs - Kit (AppliChem) in 30 µl Bideest umgepuffert. Einmal isolierte sHSP - cDNA - Sequenzen wurden durch Rekombination in den Hefevektor gespeichert und vervielfältigt. Nach Identitätsverifikation der einzelnen Gene (Gatc Biotech AG) dienten diese im Hefevektor (pGBKT7) vorliegenden Sequenzen als Matrize für alle weiteren Rekombinationen mit anderen in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (pGADT7, pBADM-11, pRT:YFP, pRT:CFP, pET28(a)). Weiterhin wurden die gesicherten Sequenzen für die Erstellung der analysierten Deletionskonstrukte bzw. der Chimäre verwendet.

### 2.2.3 Plasmidklonierungen

#### Herstellung der Fluoreszenzvektoren für *in vivo* Lokalisationsstudien

Der Vektor für die Expression von Fluoreszenzproteinen in Pflanzen basierte auf der pRT - Vektoren Serie (Topfer et al., 1988). Es wurden alle verwendeten sHSP cDNA - Sequenzen mittels PCR, mit einem Hefvektor als Matrize und adäquaten *Primern*, neu vervielfältigt und über EcoRI / XbaI Schnittstellen mit dem entsprechend geöffneten und dephosphorilierten Fluoreszenzvektor (YFP oder CFP) rekombiniert. Die Ligationsansätze wurden in chemisch kompetente *E. coli* Zellen vom Stamm Top10F' transformiert.

#### Herstellung der Köder- / Beutevektoren für die Hefe 2-Hybrid Analyse

Gewünschte Köder- (pGBKT7) und Beutevektorkombinationen (pGADT7) wurden wie vom Hersteller (Clontech) empfohlen hergestellt. Die für die jeweilige Plasmidrekombination erforderlichen Restriktionsenzyme, Phosphatasen sowie Ligasen wurden immer bei Temperaturen wie vom Enzymhersteller (NEB) empfohlen in den dafür mitgelieferten Puffern eingesetzt. Mittels Restriktionsanalysen vorgetestete Insertionen wurden sequenziert (Gatc Biotech AG). Wie beschrieben dienten diese verifizierten cDNA-Sequenzen als Matrize für alle weiteren Vektorrekombinationen. Rekombinierte Hefvektoren wurden in *E. coli* Zellen vom Stamm Top10F' zur Erstellung von Plasmidvorräten transformiert.

#### Herstellung rekombinanter Vektoren für sHSP-Expression und Reinigung

Die in die Hefvektoren rekombinierten sHSP cDNA Sequenzen wurden mittels PCR vervielfältigt und über EcoRI / XhoI Schnittstellen mit dem entsprechend geöffneten und dephosphorilierten Expressionsvektor pBADM-11 (EMBL *protein purification and expression facility*, Heidelberg, Germany) rekombiniert. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* Zellen vom Stamm BL21 transformiert. Exemplarische Analyse von At18.1 ohne Epitop, erfolgte mit dem Expressionsplasmid pET28(a), welches mit NcoI / EcoRI geöffnet wurde. Dadurch wurde das N-terminale His-Epitop aus dem Plasmid entfernt.

### **Chemische Transformation in *E. coli***

Pro Transformationsansatz wurden je 100 µl kompetente *E. coli* Top10F' oder BL21 Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 5 µl Ligationsansatz (entsprach ~19 ng Plasmid-DNA) zugegeben. Ansonsten wurde gearbeitet wie in (Sambrook, 2006) beschrieben.

## **2.2.4 Isolierung, Identifizierung und Sicherung rekombinanter Plasmide**

### **Plasmid - Minipräparation von *E. coli* Klonen**

Wenn nur geringere Mengen Plasmid - DNA gewonnen werden sollten, wurde eine Plasmid - Präparation in kleinem Maßstab mit Hilfe eines Minipräparations - Kit durchgeführt. Von einer ü. N. Kultur wurden 2 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und durch 30 s zentrifugieren in der Tischzentrifuge bei 13.000rpm pelletiert. Die weitere Präparation erfolgte dann entsprechend der mitgelieferten Anleitung.

### **Alkalische Lyse zum Anlegen von DNA-Vorräten**

Von neu erstellten und durch Sequenzierung geprüften Plasmiden wurden Vorräte mittels alkalischer Lyse angelegt. Es wurden jeweils 4 ml oder bei Bedarf ein entsprechend vielfaches einer ü. N. Kultur für einen Lyse Ansatz eingesetzt. Es wurde nach den in (Feliciello and Chinali, 1993) und (Ehrt and Schnappinger, 2003) beschriebenen Methoden gearbeitet. Die isolierte Plasmid DNA wurde vor der weiteren Verwendung oder Lagerung photometrisch quantifiziert und einem analytischen Verdau unterzogen. Die auf diese Weise erstellten und geprüften DNA - Vorräte wurden bei -20 °C bis zur jeweiligen weiteren Verwendung gelagert.

### **Herstellung von *E. coli* Stammkulturen**

Von den getesteten rekombinanten Plasmiden wurden die entsprechenden *E. coli* Klone in Form von Stammkulturen in Glyzerin gesichert. Stammkulturen wurden wie in (Sambrook, 2006) vorgeschlagen erstellt. Lagerung der Stammkulturen erfolgte bei -80 °C.

## 2.2.5 Expression und Reinigung der zu untersuchenden Proteine

### Proteinexpression und Reinigung:

Die mit N-terminalen His6-Epitop versehenen sHSPs wurden nach folgendem Schema gereinigt: Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer  $OD_{600nm}$  von 0.4 - 0.6 mit 0.2 % (w/v) Arabinose bei 37 °C für 4 - 8 h. Nach der Lyse (*French press* 21.000 N) und Verwerfen des Zellpellets erfolgte eine Fraktionierung mithilfe von Ammoniumsulfatpuffer in 10 % (v/v) Schritten. Es wurden die Fraktionen von 20 - 80 % vereint und weiterverwendet. Die weitere Reinigung erfolgte über 5 ml Ni-NTA Agarose Säule im *gravity flow* verfahren. Die Säulenchromatographie erfolgte wie vom Hersteller empfohlen. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit geprüft und quantifiziert. Die reinsten Fraktionen wurden vereint und gegen einen Niedrigsalzpuffer (50 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.6) ü. N. bei 4 °C dialysiert. In ausgewählten Fällen wurde mittels kommerziell erworbener TEV-Protease der N-terminale His6-Tag geschnitten. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

At18.1 Expression wurde mit Hilfe von 1 mM IPTG bei 37 °C für 4 - 8 h induziert. Zellen wurden geerntet und fraktioniert wie oben beschrieben. At18.1 wurde mittels Hydroxyapatit nach Herstellerempfehlung (BioRAD) gereinigt. Die reinsten Fraktionen wurden ebenfalls gesammelt und gegen den beschriebenen Niedrigsalzpuffer dialysiert.

Western-Blots wurden zur Überprüfung, dass das gewünschte Protein selektiv gereinigt wurde, verwendet. Es wurden Antikörper gegen *P. sativum* Klasse 1 sHSPs ( $\alpha$ -Cl 1:10.000) oder gegen das N-terminale His6-Epitop ( $\alpha$ -His 1:1.000) verwendet.

Das neue Klient CPH1 $\Delta$ 2 konnte nach einem bereits etablierten Schema gereinigt werden (Essen et al., 2008). Ein His-Epitop versehenes Apoprotein konnte zusammen mit PCB (Phycocyanobilin) in *E. coli* ko-exprimiert werden, so dass bereits assembliertes Holoprotein gereinigt wurde (Frankenberg et al., 2001; Landgraf et al., 2001).

## 2.2.6 Interaktionsanalyse

### ***In vivo* Lokalisationsstudien in transfizierter *Allium cepa* Epidermis**

Es wurden jeweils 1,5 µg eines Plasmids (pRT - Series) pro Beschuss mit der *particle inflow gun* (PIG) eingesetzt. Die Transfektion in Zwiebelzellen erfolgte nach einem Standardprotokoll (Bhat et al., 2001) mit 1,1 µm großen Wolframkugeln (BioRAD). Die transfizierten Zwiebelzellen wurden im Dunkeln für 16 - 18 h bei RT inkubiert bevor sie unter dem Makroskop analysiert wurden. Nach der ersten Inspektion wurden die Zellen einem kurzen Hitzeimpuls für 1 h bei 42 °C im vortemperierten Hybridisierungssofen ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut makroskopisch analysiert. Nach 12 - 16 h Erholungszeit wurden die Zellen ein letztes Mal betrachtet. Es wurden alle sHSP der Klassen 1 und 2 als YFP- und CFP-Fusionsproteine in Bezug auf Lokalisation bei RT und Hitzestress untersucht. Zum Vergleich wurden Zwiebelzellen mit YFP bzw. CFP ohne angehängte sHSP-Fusion transfiziert und analysiert. Als Kernmarker diente pSAT6:Cherry:VirD2NLS (Citovsky et al., 2006).

### **Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae***

Es wurde das Matchmaker™ Two-Hybrid System 3 von Clontech verwendet und nach den im „*Yeast Protocols Handbook*“ beschriebenen Methoden die Hefen kultiviert und transformiert. Für alle Hefearbeiten wurde der Stamm *S. cerevisiae* AH109 verwendet. Es wurde stets mit sterilen Lösungen gearbeitet.

### **Chemische Hefetransformation und Mangelmedium Selektion:**

Es wurde eine frisch erstellte stationäre Hefekultur zu 200 ml frischem YPDA Medium in einem Schikanekolben gegeben bis eine OD<sub>600</sub> von 0.15 - 0.25 erreicht wurde. Anschließend wurde die frisch angesetzte Kultur schüttelnd bei 30 °C für 2 - 5 h inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0.4 - 0.45 erreicht wurde. Es wurden 2 x 35 ml der Flüssigkultur in je ein steriles 50 ml Sarstedt Tube gegeben und mit 1000g bei RT für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die beiden erhaltenen Hefepellets in 40 ml LiAc vereint. Nach suspendieren der Hefepellets wurde die Zellsuspension wieder mit 1000g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach

erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 0.5 - 1 ml 1x TE/LiAc-Puffer suspendiert. Das eingesetzte Volumen richtete sich nach der OD<sub>600</sub> der geernteten Flüssigkultur. Pro Transformation wurden 0.1 ml der erhaltenen chemisch kompetenten Hefezellen eingesetzt. Es wurden jeweils die zu untersuchenden Köder- / Beutevektorkombinationen nach der im „*Yeast Protocols Handbook*“ von Clontech vorgeschlagenen Methode transformiert. Transformierte Hefen wurden auf den mit vorgeschlagenem Minimalmedium versetzten Agarplatten selektiert. Erhaltene Klone wurden für eine Interaktionsanalyse auf stringenter Selektionsmedien ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

#### **Flüssigkultur Analyse mit ONPG als Substrat**

Die *in vivo* Flüssigkultur Analyse mit ONPG als Substrat wurde durchgeführt wie vom Hersteller (Clontech) vorgegeben. Die Inkubationszeit betrug zwischen 10 - 18 h. Die *β-Galactose Units* wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\beta - \text{Gal units} = 1.000 * OD_{420} / (t * V * OD_{600})$$

t = Inkubationszeit (in min)

V = 0,1 ml \* „Konzentrationsfaktor“\*

OD<sub>600</sub> = A<sub>600</sub> von 1 ml eingesetzter Hefekultur

\*Der Konzentrationsfaktor betrug 5. Es wurden 1,5 ml einer Hefeflüssigkultur in 0,3 ml Z-Puffer aufgenommen.

Zur statistischen Absicherung wurden alle Experimente mindestens dreimal mit jeweils verschiedenen Hefekolonien pro Interaktionsansatz durchgeführt.

#### **Affinitätschromatographie basierte *pull-down* Analyse:**

Es wurde das Interaktionsverhalten verschiedener gereinigter sHSPs untersucht. Es wurde getestet, ob ein an Ni-Agarose gebundenes Köderprotein ein zugegebenes frei in Lösung befindliches Beuteprotein spezifisch binden kann. In dieser Interaktionsanalyse wurden ein Klasse 1 (At18.1) und ein Klasse 2 (At17.6) sHSP-Beuteprotein exemplarisch ohne His-Epitop vorbereitet, so dass unspezifische Bindungen an Ni-Agarose minimiert wurden. Es wurden Beute- und Köderprotein mit Ni-Agarose auf einem Schüttler über Nacht bei RT inkubiert (200rpm). Nach

Inkubation wurden die Proben jeweils auf *Micro-Spin tubes* geladen und per Zentrifugation (max. 50g) wurden einzelne Fraktionen gesammelt. Zuerst wurden im Durchfluss (*flow through*) die ungebundenen Proteinreste gesammelt, bevor nach zwei separaten Waschschritten (zweimal 300 µl) mit Elutionspuffer (zweimal 50 µl) eluiert wurde. Waschpuffer und Elutionspuffer entsprachen den zur sHSP Reinigung verwendeten Puffer. Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe der SDS-PAGE analysiert. Es wurde unspezifische Bindung der Beuteproteine an die Ni-Agarose getestet, sowie die unspezifische Bindung von Köderproteinen mit BSA. Zur Bestimmung der Selektivität der Interaktion wurde At18.1 nicht vorgereinigt, sondern in einem *E. coli* Extrakt vorliegend zugegeben.

## **2.2.7 Strukturanalyse kleine Hitzestressproteine**

### **Löslichkeitsstudien**

Für eine Löslichkeitsstudie wurde eine definierte Menge an sHSPs (~4 µg) für 1 h bei verschiedenen Temperaturen (60 - 80 °C) in einer PCR-Maschine (Biometra T3000) inkubiert. Vor dem jeweiligen Inkubationsschritt wurde je ein Aliquot als Ladekontrolle abgenommen. Denaturierte, unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation (5 min bei 21.000g) pelletiert. Nach Überführung des löslichen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde das verbleibende Pellet in Puffer suspendiert. Das Volumen entsprach dem des abgenommenen Überstandes. Der Überstand und die Pellet-Fraktion wurde mit gleichem Volumen an 6x SDS-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE vergleichend zur Ladekontrolle (eingesetztes Gesamtprotein) analysiert. Als thermolabiles Vergleichsprotein wurde Malatdehydrogenase verwendet welches ebenfalls bei verschiedenen steigenden Temperaturen für 1 h inkubiert wurde. CPH1Δ2, als neu zu etablierender sHSP-Klient, wurde der gleichen Prozedur unterzogen.

### **Circular Dichroism Spectropolarimetry (CD-Spektroskopie)**

Es wurde mit einem Jasco J-710 Spektropolarimeter, einer Zylinderküvette mit 0,02 cm Lichtweg (Hellma GmbH, Müllheim, Germany) in Sauerstoffevakuierter

Atmosphäre bei 25 °C gemessen. Die ermittelten Spektren waren gemittelte Werte aus 20 Messungen. Es wurden von einem Protein jeweils 12 und 20 µM eingesetzt. Die eingesetzten Proteine hatten eine Konzentration zwischen (0,5 - 2 µg / µl) und lagen in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.6 vor. Das von 10 mM Phosphatpuffer gemessene Pufferspektrum wurde immer von den erhaltenen Proteinmessungen abgezogen. Während der Temperatur induzierten Denaturierungsreihe wurde die Temperatur in 10 °C Schritten bis 80 °C erhöht. Bei jeder neuen Temperatur wurde 10 min gewartet, so dass sich die gleiche Temperatur in der Küvette einstellen konnte, bevor gemessen wurde. Chemisch induzierte Denaturierungen erfolgten mit Proben, die mit den im Ergebnisteil angezeigten molaren Mengen Guanidinium Hydrochlorid jeweils 30 min vor der Messung versetzt wurden. Die Messung zweier sHSPs erfolgte mit äquimolaren Mengen.

#### **Bis-ANS Bindungsanalyse**

Bis-ANS ist ein amphiphiler Fluoreszenzfarbstoff, welcher erst nach Bindung an hydrophobe Strukturen per Fluoreszenz nachweisbar ist und bereits häufig auf verschiedene Weisen zur HSP Analyse eingesetzt wurde (Shi et al., 1994). Hier wurde eine nach (Lee et al., 1997) und (Basha et al., 2011) für SDS-PAGE adaptierte Methode verwendet. Es wurde gearbeitet wie dort beschrieben, wobei zur zusätzlichen quantitativen Auswertung eine Analyse Software (Quantity One, BioRAD) verwendet wurde. Mit ihrer Hilfe wurden die dokumentierte Fluoreszenz- und die dazu gehörige Coomassie-Signalintensitäten gemessen, welche zur Berechnung der Fluoreszenz- zu Coomassie-Intensitäten Ratio genutzt wurden.

#### **Blue Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Die Präparation der Gele, die verwendeten Puffer, sowie die Durchführung erfolgten wie bei (Wittig et al., 2006) beschrieben. Die sHSPs wurden stets einzeln, d.h. ein sHSP in steigenden Mengen (0.3 - 6 µM) auf einem 4 - 19.5 % *Blue Native* Gel geladen. Die entsprechend vortemperierten Proben wurden bei 4°C, 25 °C oder 45 °C elektrophoretisch getrennt. Auch wurden sHSPs bei 45°C für 1 h vorbehandelt, bevor diese bei 25 °C getrennt wurden (*Recovery*). Nach 45 min bei 70 V erfolgte ein Kathodenpufferwechsel bevor für 17 - 36 h bei 20 – 30 V weitergetrennt wurde bis die Ladepufferfront durchgelaufen war. Als Vergleichsproteine wurden Thyroglobulin



(669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (240 kDa), Bovine Serum Albumin (BSA, 67 kDa), Karboanhydrase (30 kDa) und Myoglobin (17 kDa) als Marker angesetzt und verwendet. BN - Gele wurden mit Coomassie *brilliant blue* R250 gefärbt.

#### **Size-exclusion chromatography (SEC)**

Alle Experimente wurden mit einer Superdex200 10/30 Säule (Trennbereich von ~800 - 10 kDa) mit einem Äkta-Purifier System (Amersham, GE) durchgeführt. Es wurden je 125 µg an sHSPs eingesetzt und bei RT getrennt. Die Flussrate betrug 0.5 ml / min und der Durchfluss (Eluat) wurde bei 280 nm gemessen. Bei Experimente mit CPH1Δ2 wurden zusätzlich bei den Wellenlängen 660 und 700 nm gemessen. Zur Eichung der Säule wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (240 kDa), Bovine Serum Albumin (BSA, 67 kDa), Myoglobin (17 kDa) verwendet. 1 ml Fraktionen wurden zwischen 8 - 18 ml gesammelt, Trichloressigsäure gefällt, mit Aceton gewaschen und nach Aufnahme in SDS-Ladepuffer mittels SDS-PAGE analysiert (Mechin et al., 2007).

### **2.2.8 Funktionsanalyse kleiner Hitzestressproteine**

#### **Klientenschutz (Aggregationsprävention)**

Experimente zum Klientenschutz (Aggregationsprävention) wurden durchgeführt wie bereits beschrieben (Basha et al., 2006). Es wurden je 3 µM MDH mit verschiedenen Mengen an jeweiligen sHSPs (0, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 µM) für 1 h bei 45 °C inkubiert. In einem Kontrollexperiment wurden steigende Mengen Lysozym zugegeben. Nach Trennung in löslichen Überstand und unlösliches Pellet wurden diese Fraktionen Vergleichend mittels SDS-PAGE getrennt und analysiert.

CPH1Δ2 wurde in äquimolarer Ratio zu At17.6B oder im zehnfachen Überschuss zu At17.8 zugegeben bevor es für 1 h bei 55 °C inkubiert wurde. Zur Kontrolle wurde CPH1Δ2 alleine oder mit MDH inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben fotografiert.

Exemplarisch wurden einzelne Ansätze mittels SEC analysiert.

**Aktivitätserhaltungsstudien:**

Für das jeweilig zu untersuchenden Reporterenzymen (MDH und HRP) wurde in einer Aktivitätstestreihe die optimale Enzymmenge für eine Analyse ermittelt. Es sollten innerhalb von 30 s Reaktionszeit die Absorption von 1.0, bei der für das jeweilige Enzymprodukt zu messenden Wellenlänge, nicht überschritten werden. Nach Ermittlung der geeigneten Enzymmenge wurde eine Denaturierungsreihe aufgenommen. Dabei wurde ein Aliquot vom jeweiligen Reporterenzym für 1 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und im Anschluss wurde die Restaktivität photometrisch bei 25 °C bestimmt. Die durchgeführten Vorexperimente zeigten, dass sich für MDH eine Denaturierungstemperatur von 45 °C und für HRP 70 °C eignete. Die gemessenen Restaktivitäten betrugen bei MDH 75 - 80 % und für HRP ~50 %.

Die Messung der MDH, durch Zugabe von NADPH und Oxalacetat, erfolgte wie beschrieben (Panepucci et al., 2000).

Das Reporterenzym HRP wurde mit o-Phenylendiamin (OPD) wie beschrieben gemessen (Hamilton et al., 1999). Jede Enzymaktivitätsmessung bestand aus einem Triplikat derselben Probe und jede Aktivitätsmessung wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Die bei 25 °C gemessenen Enzymaktivitäten ( $\Delta A \cdot s^{-1}$ ) wurden 100 % gesetzt. Die anderen Aktivitäten wurden dem entsprechend in Relation gesetzt. Es wurde ein SHIMADZU mini1240 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet.

CPH1 $\Delta$ 2 wurde vorbehandelt wie zuvor im Abschnitt Klientenschutz beschrieben. Der jeweilig bei verschiedenen Vorbehandlungstemperaturen erhaltene Überstand wurde auf rot / dunkel-rot Licht induzierte Fotokonversion getestet. Pr / Pfr Mixtur wurde mit geeigneten LEDs (Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich) wie beschrieben induziert (Rohmer et al., 2008). CPH1 $\Delta$ 2 Spektren wurden mit einem Diodenarray Spectrophotometer (Agilent 8453) gemessen.

sHSPs wurden in den jeweilig angegebenen Ratios zugegeben (siehe Ergebnisse).

### 3 Ergebnisse

Die nachfolgenden Experimente sollten einen Einblick in das Interaktionsverhalten von sHSPs aus verschiedenen zytosolischer Klassen ermöglichen. Die in der Interaktionsanalyse untersuchten acht verschiedenen sHSPs wurden einer vergleichenden Struktur- und Funktionsanalyse unterzogen.

#### 3.1 sHSP cDNA Isolierung, Klonierung und Proteinexpression

##### 3.1.1 cDNA Synthese mit anschließender sHSP cDNA Isolierung

Für die nachfolgenden Arbeiten an sHSPs wurden zunächst deren kodierenden Gensequenzen (*engl. coding sequences* = CDS) benötigt. Diese wurden aus RNA von 3 - 4 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen, welche kurz vor Ernte keinen oder einen Hitzestress (HS) erhielten, gewonnen. Wie der Abbildung 6A zu erkennen ist, war die Gesamt-RNA-Präparation von guter Qualität. Es wurden je 5 µg der entsprechenden Gesamt-RNA zur Reversen Transkription eingesetzt. Die jeweilig erhaltenen cDNAs waren für eine Standard PCR zum Ziele der spezifischen sHSP CDS Isolierung einsatzbereit. Das konstitutiv transkribierte NPH3 (*non-phototropic-hypocotyl 3*) diente als Kontrolle, dass beide erstellten cDNAs (RT und HS) für eine PCR die entsprechende Quantität und Qualität aufwiesen (Abbildung 6A, rechte Spalte). Die Katalogisierung der HSPs von Scharf (2001) diente als Vorlage zur Zuordnung der zu untersuchenden sHSPs in die zytosolischen Klassen 1 und 2. Die benötigten Primer Sequenzen wurden von den jeweiligen zu untersuchenden in [www.tair.org](http://www.tair.org) gelisteten sHSP cDNA Sequenzen abgeleitet. Die zu untersuchenden sHSP CDS Sequenzen wurden mit Hilfe dieser Primer vervielfältigt (Abbildung 6C). In diesem Ansatz wurde NPH3ΔN (1,2 Kbp) als Vergleichsprodukt gewählt. Die semi-quantitative PCR zeigte, dass die verwendeten Bedingungen zu einer vergleichbaren Vervielfältigung einer konstitutiv vorhandenen cDNA führten. Für alle sHSP spezifischen Primerkombinationen wurden Produkte in der erwarteten Größenordnung um 0,5 kbp erhalten. Mit der aus hitzestressierten Pflanzen gewonnenen cDNA (HS) wurden immer größere Mengen an PCR Produkten erhalten als mit der unter Kontrollbedingungen gewonnenen cDNA (RT). At17.6C-CI zeigte

von allen getesteten sHSPs das intensivste Produktsignal bei RT Bedingungen während At17.6-CII als einziges sHSP kein Signal bei RT aufwies.

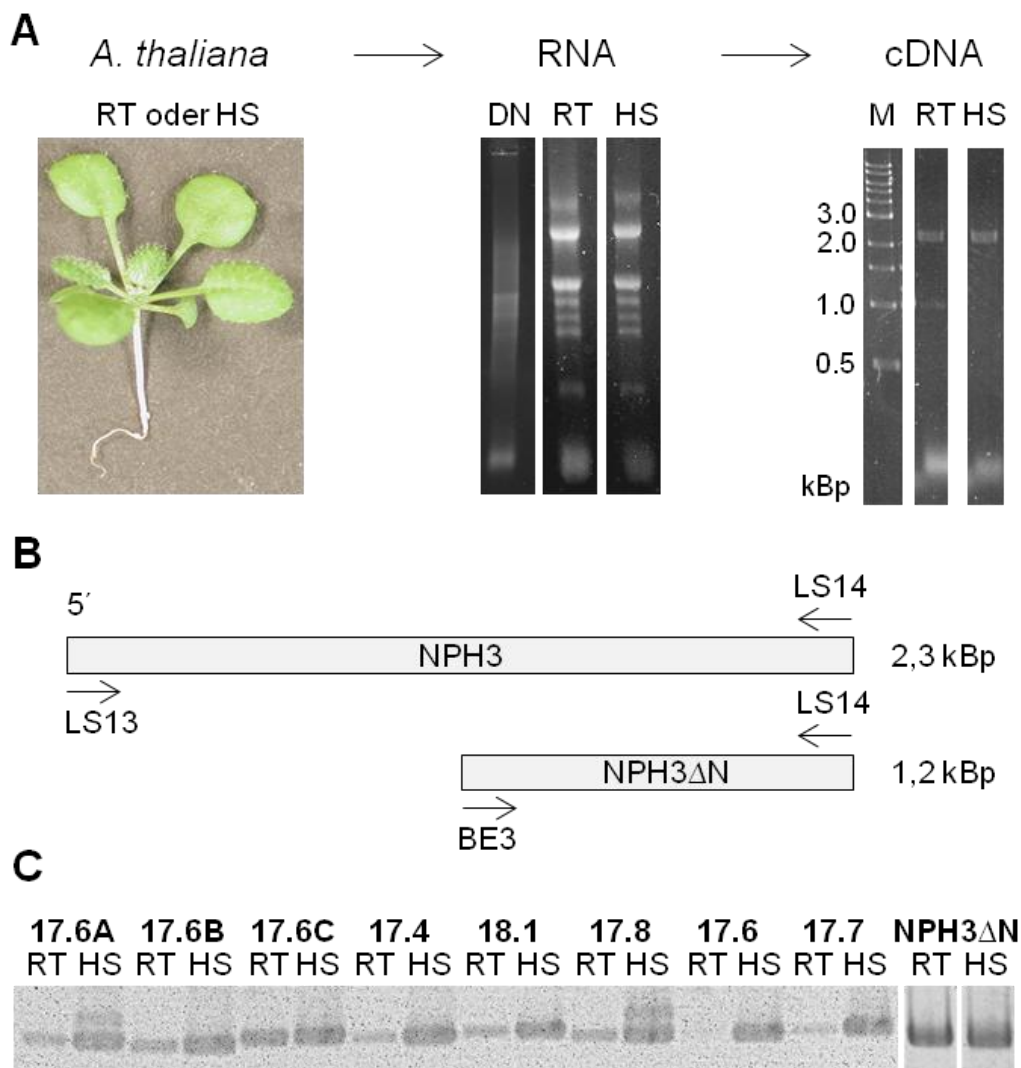


Abbildung 6: Isolierung der zu untersuchenden sHSP CDS und semi-quantitative RT-PCR

(A) Aus RT oder hitzebehandelten *A. thaliana* Pflanzen wurde RNA extrahiert und quantifiziert. Zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle wurden je ein Aliquot der frisch isolierten RNA-Präparation gegen ein Aliquot denaturierter RNA-Präparation (DN) aufgetragen. Für die folgende cDNA Synthese wurden je 5 µg RNA eingesetzt. In einer Kontroll-PCR wurde die erstellten cDNAs (RT und HS) gegen die konstitutiv vorhandene NPH3 (*non-phototropic-hypocotyl 3*) cDNA getestet (Primerpaar LS13 / LS14). (B) Schematische Übersicht der Bindestellen von den verwendeten NPH3 spezifischen Primern. (C) Ergebnis der Vervielfältigung der verschiedenen sHSP cDNA Sequenzen nach Gelelektrophorese. Die in Abschnitt Material gelisteten Primerkombinationen wurden für die Vervielfältigung der cDNA-Sequenzen von AtHSP-CI 17.6A / 17.6B / 17.6C / 17.4 / 18.1 / 17.8 und AtHSP-CII 17.6 / 17.7 eingesetzt. Für die NPH3 Deletion wurde das Primerpaar BE3 / LS-14 verwendet.

Allgemein wurde aus den RT Proben viel weniger Klasse 2 sHSP Transkripte vervielfältigt als von Klasse 1. Die aus hitzegeestressten Pflanzen gewonnene cDNA zeigte bei allen sHSPs ungefähr gleich viel Transkripte. At17.6A-CI und At17.8-CI zeigten ein weiteres Signal bei 550 - 600 Bp. Dieses entsprach nicht der erwarteten

Größe und wurde nicht weiter untersucht. Die mittels PCR vervielfältigten sHSP cDNA-Sequenzen wurden in die folgenden Vektoren kloniert: pGBKT7 / pGADT7 / pBADM-11 / pET28 (a) / pRT:YFP / pRT:CFP. Abbildung 7 zeigt eine vergleichende schematische Übersicht der in dem Expressionsvektor pBADM-11 vorliegenden neu erstellten Konstrukte nach deren Translation.

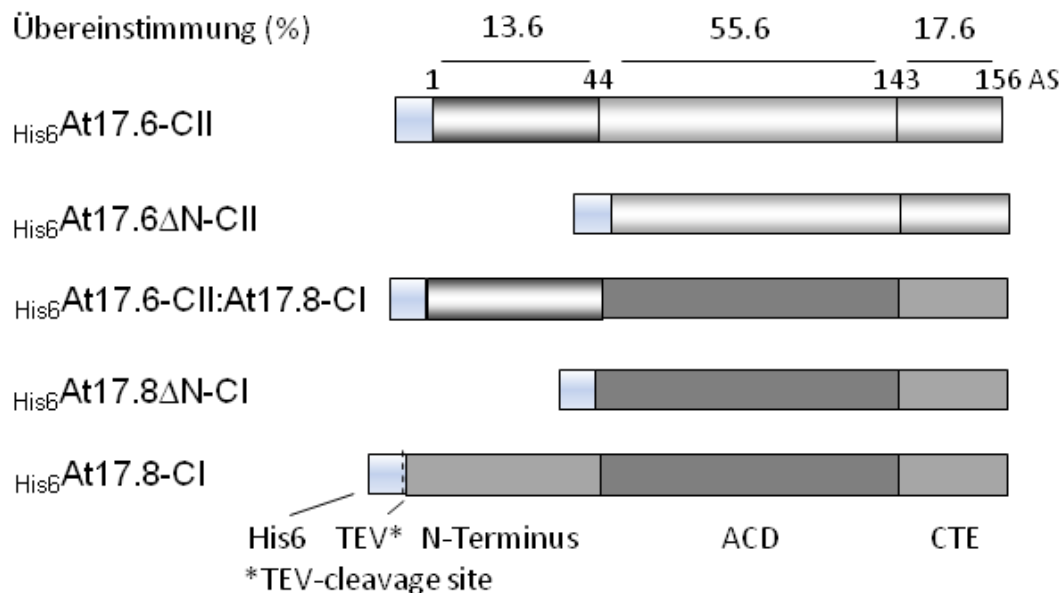


Abbildung 7: Schema von untersuchten Klasse 1 und 2 sHSPs, sowie deren Modifikationen

Von den sogenannten *full-length* sHSPs wurden exemplarisch N-terminale Deletionen, sowie eine Chimäre, bestehend aus einem Klasse 2 N-Terminus, sowie einer Klasse 1 ACD mit CTE erstellt. Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Abschnitten (berechnet auf Basis der Aminosäuren) wurden angegeben (in %).

### 3.1.2 Expression und Reinigung von sHSPs für weitere Analysen

His6sHSPs wurden mittels Ni-Agarose, At18.1 mittels Hydroxyapatit gereinigt. Ein Schema der jeweilig verwendeten Expressionsvektoren wurde dem Anhang beigelegt. Die zu untersuchenden sHSPs wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Zur Qualitäts- bzw. Quantitätskontrolle wurde jeder Reinigungsschritt dokumentiert wie nachfolgend exemplarisch für His6At18.1-CI und At18.1-CI dargestellt (Abbildung 8). Die erhaltenen Proteinproben zeigten selektive Reinigung eines Proteins mit der erwarteten Größe (At18.1-CI, His6At18.1-CI: ~20 kDa). Beide verwendete Antikörper zeigten hohe Spezifität, doch war die Signalstärke bei α-CI Antikörper höher.

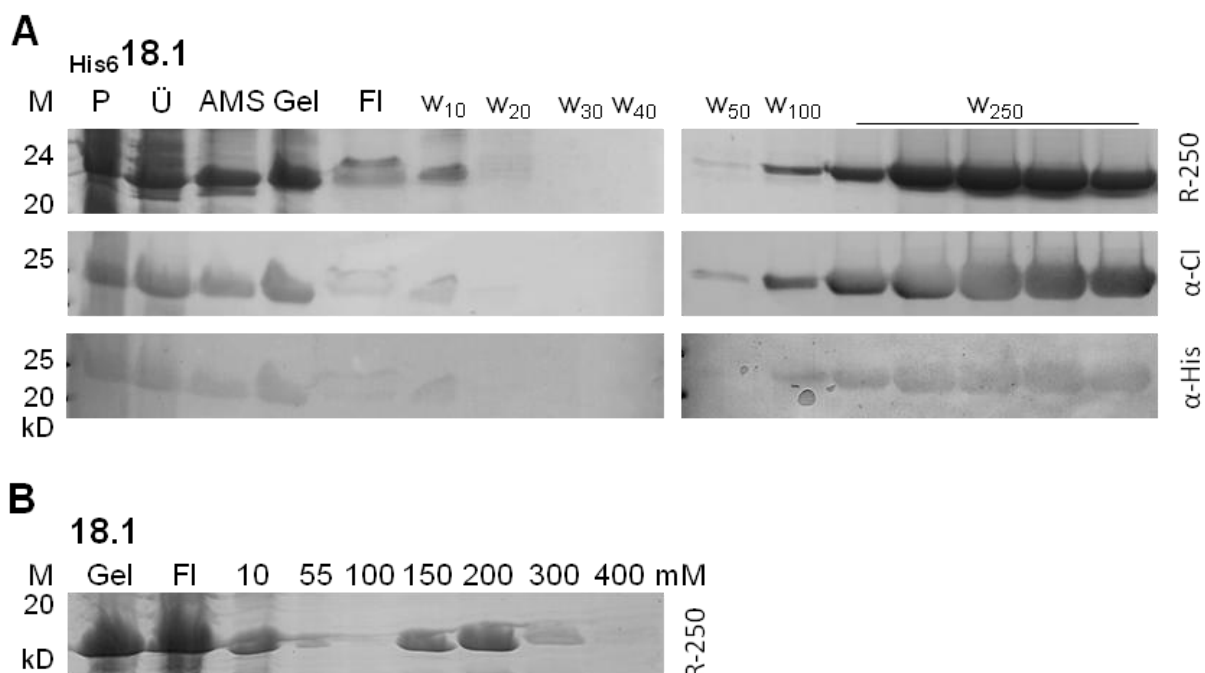


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung verschiedener sHSP Reinigungsmethoden mittels Säulenchromatographie

(A) Von jeder sHSP Reinigung wurde ein Aliquot des *E. coli* Zellpellets (P), sowie des Überstandes (Ü) nach der Lyse aufgehoben. Der restliche Überstand wurde auf eine 5 ml Ni-Agarose Säule geladen (Gel) und der Durchfluss (FI) wurde gesammelt. Das gebundene Protein wurde mit Waschpuffer (mit steigenden Imidazol-Konzentrationen;  $w_{10} = 10$  mM,  $w_{20} = 20$  mM ...) versetzt und bis zur Elution (250 mM) des gebundenen sHSPs gewaschen. Das obere Bild zeigt Aliquots der einzelnen mittels SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen, während das jeweilig darunterliegende Bild einen Western-Blot mit vergleichbaren Aliquots zeigt. Bei den gezeigten Western-Blots wurden primäre Antikörper gegen Klasse 1 sHSPs aus *P. sativum*, sowie ein kommerziell erworbener His6-Antikörper verwendet. (B) At18.1-Cl produzierende *E. coli* Zellen wurden unter vergleichbaren Expressions- und Erntebedingungen bearbeitet. Der nach Zentrifugation des resolubilisierten AMS Präzipitats gewonnene lösliche Überstand wurde auf eine 5 ml Hydroxyapatit-Säule geladen (Gel). Der Durchfluss wurde gesammelt (FI), bevor die Säule mit je 2 Säulenvolumen an steigenden NaCl Konzentrationen (10mM, 55mM ...) bis zur Elution (150 und 200 mM) von At18.1-Cl gewaschen wurde.

Das für spätere Analysen wichtige Abtrennen des His6-Epitops (z.B. für die Affinitätschromatographie basierte *pull-down* Analyse) wurde ebenfalls dokumentiert (Abbildung 9). Es wurde das zu schneidende Fusionsprotein ( $_{\text{His6}}$ At17.8-Cl) mit TEV-Protease für 4 h bei RT inkubiert, bevor eine Abtrennung des nicht geschnittenen Fusionsproteins und der TEV-Protease mittels Ni-Agarose erfolgte. Im Durchfluss war nur noch Protein ohne His-TEV-tag ( $_{\text{cut}}$ At17.8-Cl) zu finden. Geschnittenes Produkt war am Molekulargewicht nach SDS-PAGE Trennung unterscheidbar. Das längere, nicht geschnittene  $_{\text{His6}}$ At17.8-Cl lief ein wenig langsamer als das geschnittene Produkt  $_{\text{cut}}$ At17.8-Cl.

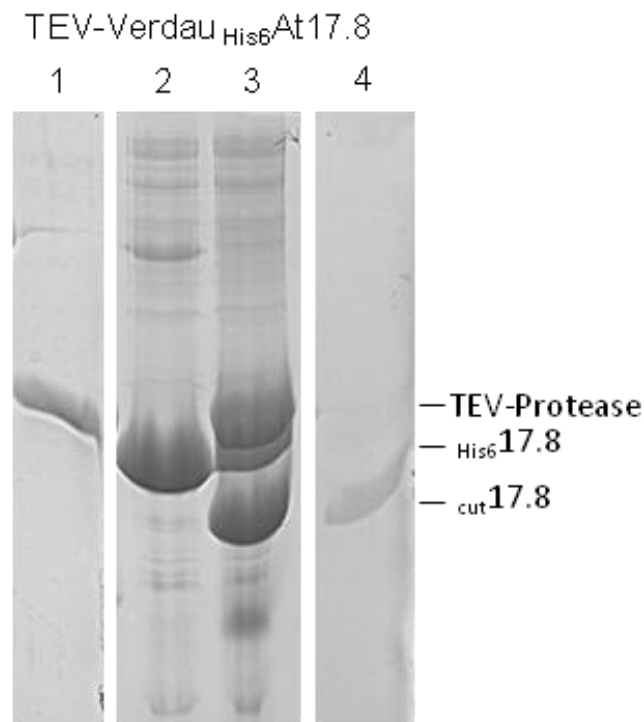


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung einer Epitop Abtrennung an gereinigten His6SHSPs

Kommerziell erworbene TEV-Protease (1) wurde zu His6At17.8 (2) zugegeben und inkubiert (3). Das ungeschnittene Edukt (2), sowie die zugesetzte TEV-Protease (1) wurden vom geschnittenen Produkt (4) nach Herstellerprotokoll abgetrennt.

## 3.2 Interaktionsanalyse

Die für Interaktionsstudien ausgewählten sHSPs wurden zuerst überprüft, ob sie im gleichen Zellkompartiment vorlagen (*in vivo* Lokalisationsstudien). Im Anschluss wurden verschiedene sHSP-Monomere (tertiäre sHSP Strukturen) *in vivo* auf Interaktion (YTH) getestet, bevor gereinigte sHSPs (in quartären Strukturen vorliegend) erneut *in vitro* auf Interaktion untersucht wurden. Parallel dazu wurde dokumentiert, ob Interaktionen Veränderungen der sekundären Struktur benötigen oder hervorrufen.

### 3.2.1 *In vivo* sHSP Lokalisationsstudien

Die Lokalisationsstudien wurden in Zwiebelepidermis Zellen durchgeführt, da diese leicht zu transfizieren und zu beobachten sind.

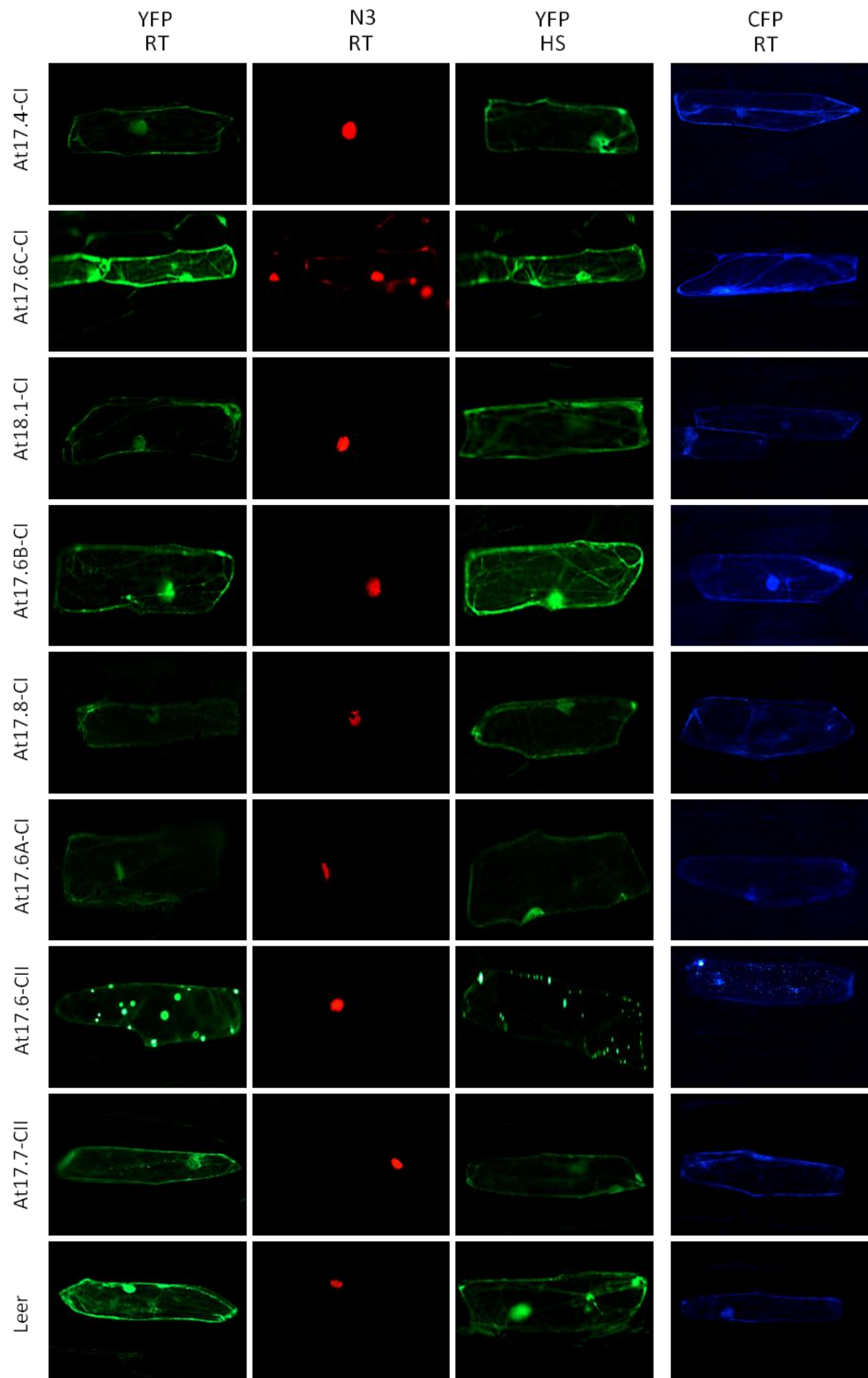


Abbildung 10: Zelluläre Lokalisation von CFP:sHSP und YFP:sHSP Fusionen in Zwiebelepidermiszellen



Alle Klasse I und Klasse II sHSPs wurden N-Terminal mit einem YFP oder CFP Molekül fusioniert und in Zwiebelepidermiszellen transfiziert. Nach 16 h wurden transfizierte Zellen unter dem entsprechenden Filter (YFP / N3 / CFP) dokumentiert. Der rot fluoreszierende Kernmarker (mCherryNLS) war nur im Kern zu finden. Die rechte Spalte präsentiert die repräsentativen Zellen, die mit CFP-Fusionen transfiziert waren, während die linken drei Spalten entsprechende Zellen die mit dem YFP-Fusionsprodukt transfiziert waren zeigt.

Für diese vergleichende *in vivo* Lokalisationsanalyse wurden alle untersuchten sHSPs (Abbildung 10) und deren Modifikationen (Abbildung 11) mit einem N-Terminalen Fluoreszenzprotein (CFP und YFP) versehen und 16 h nach Transfektion in Zwiebelepidermis Zellen dokumentiert.

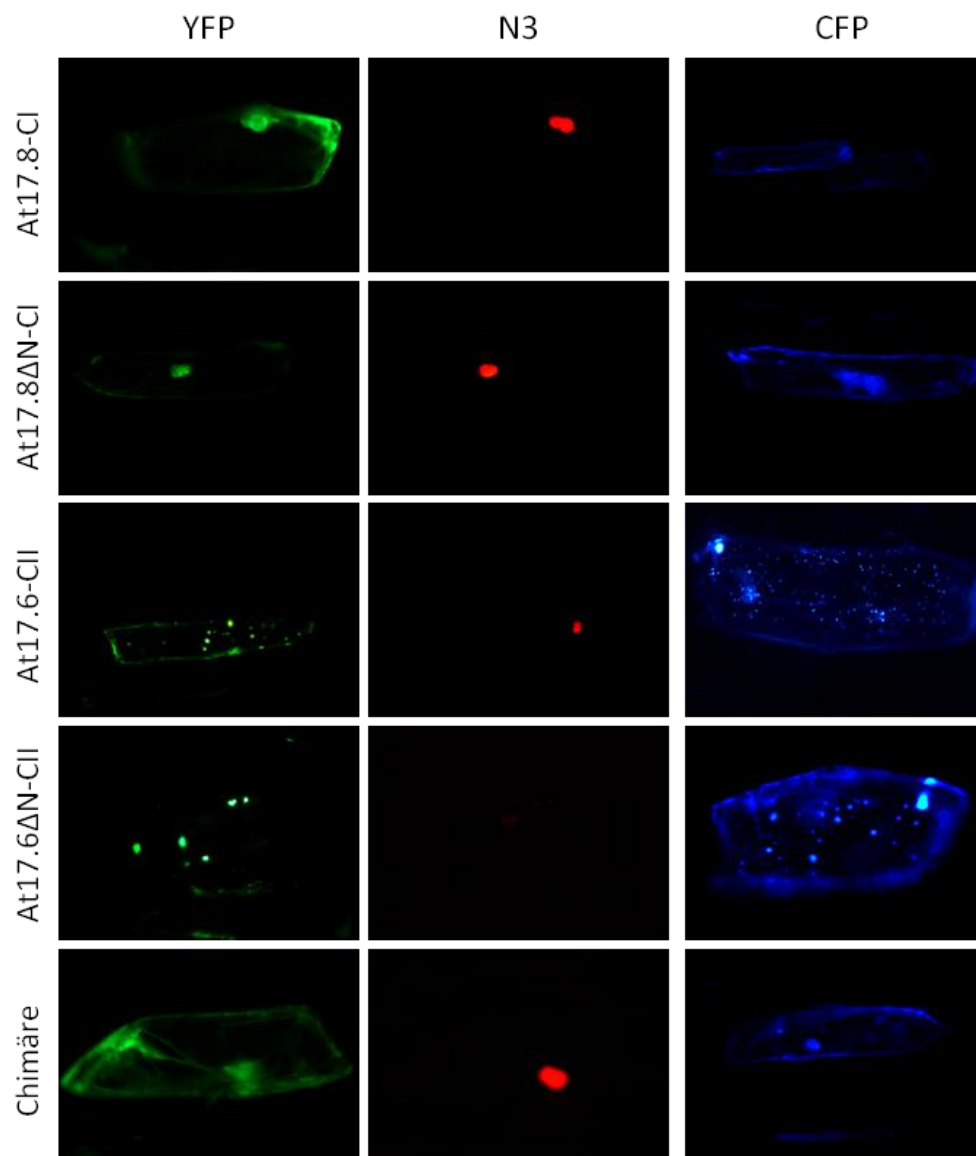


Abbildung 11: Vergleichende Gegenüberstellung der zellulären Lokalisation von Klasse I und II Proteinen im Vergleich zu ihren erstellten N-Terminal modifizierten Versionen ( $\Delta$ N und Chimäre).

YFP und CFP alleine waren gleichmäßig im Zytosol verteilt (Abbildung 10). Das nukleare Markerprotein mCherry NLS lag im Zellkern vor. Bis auf At17.6-CII waren alle sHSPs der Klasse 1 und 2 gleichmäßig im Zytosol und auch im Zellkern verteilt. At17.6-CII und At17.6 $\Delta$ N-CII zeigten Granula Bildung. Die dokumentierte

Fluoreszenzverteilung wurde weder durch die Wahl des fusionierten Reporters (CFP oder YFP) noch durch Hitzebehandlung bei 45 °C für 1 h oder durch verlängerte Expressionsdauer bei 25 °C (z.B. 16 h, 40 h, 64 h, 88 h) beeinflusst. Eine simulierte Akklimatisierung (1 h 40 °C, 1.5 h RT, 1 h 45 °C) zeigte ebenfalls keine Veränderung in der beobachteten Fluoreszenzverteilung. Da die diesbezüglich beobachteten Ergebnisse identisch waren werden in Abbildung 10 nur die Ergebnisse der Hitzebehandlung bei 45 °C für 1 h gezeigt (HS).

Das Entfernen der klassenspezifischen N-Termini (At17.8 $\Delta$ N-CI und At17.6 $\Delta$ N-CII) führte zu keiner Veränderung in der beobachteten Fluoreszenzverteilung (Abbildung 11). Das Anfügen des At17.6-CII N-Terminus an eine Klasse 1 Deletion (At17.8 $\Delta$ N-CI) führte nicht zur Granula Bildung. Die Chimäre zeigte, dass der klassenspezifische N-Terminus keinen Einfluss auf die beobachtete Fluoreszenzverteilung hatte.

Inkubation von sHSPs der Klasse 1 (CFP:sHSP-CI) mit sHSPs der Klasse 2 (YFP:At17.6-CII) resultierte in gleichmäßiger Fluoreszenzverteilung von Klasse 1 Proteinen, sowie Granula Bildung des Klasse 2 Proteins (Abbildung 12). Im besten Fall lassen sich ko-Lokalisierungen beobachten, aber generell blieb das granulare Verteilungsmuster von At17.6-CII unberührt. Auch unter Hitzestressbedingungen gab es kein davon abweichendes Verteilungsmuster (nicht gezeigt).

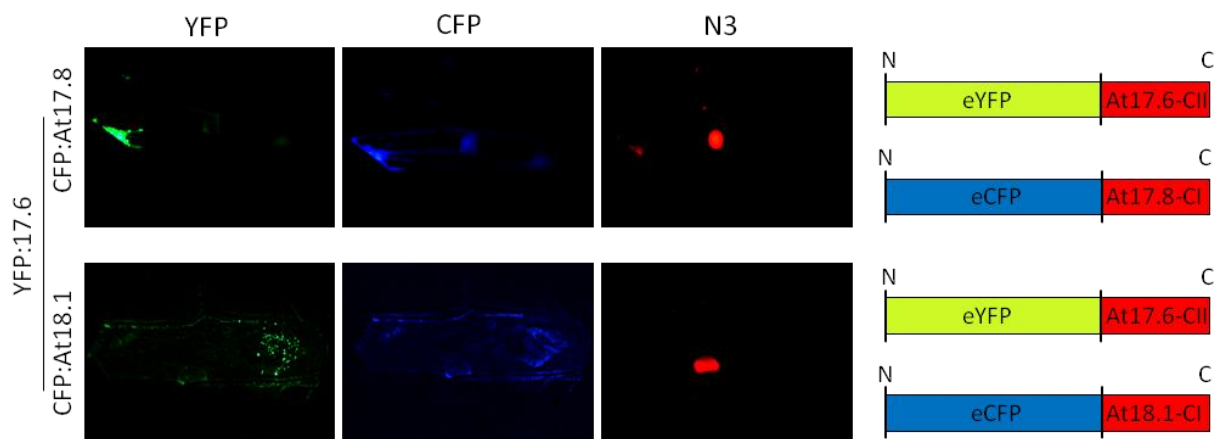
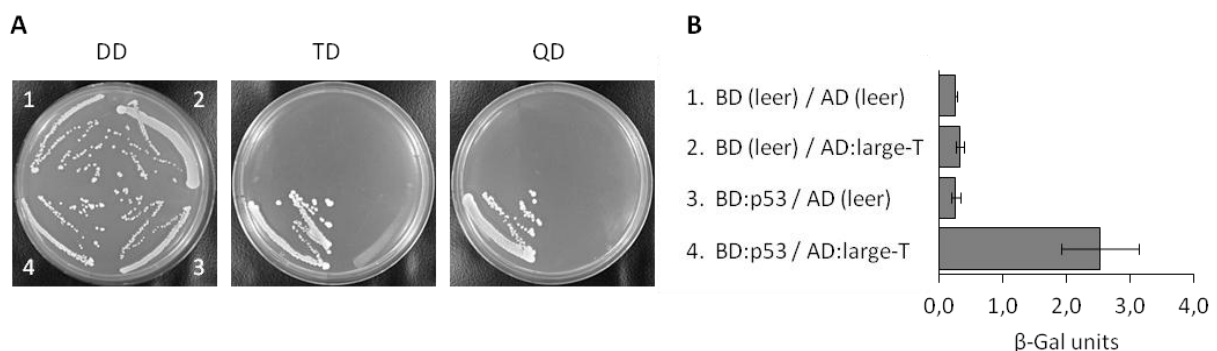


Abbildung 12: Übersicht der zellulären Lokalisation von CFP:Klasse I und YFP:Klasse II Doppeltransfektionen in Zwiebelepidermis Zellen.

### 3.2.2 Interaktionsanalyse mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems

sHSPs assemblieren aus mehreren Monomeren in eine größere quartäre Gesamtstruktur. Am häufigsten setzten sich sHSPs aus einer geraden Anzahl an Untereinheiten zusammen, so dass die kleinste mögliche gerade Einheit (Dimer) als elementarer Grundbaustein der jeweiligen quartären Gesamtstruktur vermutet wurde. Zusammen mit den vielen verschiedenen im Zytosol vorliegenden Klassenmitgliedern ergaben sich daraus verschiedene denkbare Interaktionsmöglichkeiten von sHSPs bei der Dimerisierung, welche mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems getestet wurden. Es wurden alle sHSPs und deren N-Terminal modifizierten Versionen in pGBKT7, sowie in pGADT7 inseriert (siehe Anhang). Je ein Köder- und ein Beutevektor mit sHSP Insert wurden in fast allen sich daraus ergebenden Kombinationsmöglichkeiten in Hefen (AH109) ko-transformiert. Alle zytosolischen sHSPs wurden miteinander getestet, während am N-Terminus modifizierte sHSPs in exemplarisch ausgewählten Kombinationen untersucht wurden.



**Abbildung 13: Kontrollen der Hefe 2-Hybrid Analyse.** (A) Kontrollen wurden wie vom Hersteller empfohlen auf stringenteren Mangelmedium (DD, TD, QD) selektiert. Mit Hilfe von Flüssigkulturen lassen sich Anhand der gemessenen Aktivitäten, die produzierten  $\beta$ -Gal Mengen (in *units*) errechnen. Je stärker die getestete Interaktion war, desto besser wuchsen die Hefen auf stark selektiven QD-Medium und mehr  $\beta$ -Gal (B) war nachweisbar. Die Reihenfolge in A und B ist gleich (1-4).

Als Interaktionskontrolle wurde die vom verwendeten YTH-System bereitgestellten Kontrollen verwendet (Abbildung 13). Aufgrund der Komplexität der getesteten Interaktionsmöglichkeiten wurden die erhaltenen Ergebnisse, in für verschiedene Interaktionskombinationen definierbaren Interaktionskategorien (a - d) einsortiert und dieser Reihenfolge entsprechend analysiert.

Theoretisch mögliche Interaktionskombinationen (Kategorien):

- a) Interagieren Monomere desselben sHSPs (Homodimerisierung)?

- b) Sind neben möglichen Homodimerisierungen weitere Interaktionen zwischen sHSP Monomeren derselben Klasse möglich (intra-klassenspezifische Heterodimerisierung)?
- c) Sind Interaktionen zwischen sHSP Monomeren unterschiedlicher Klassen beobachtbar (inter-klassenspezifische Heterodimerisierung)?
- d) Wie verhalten sich die erstellten Klasse 1 und 2 Deletionskonstrukte bzw. die Chimäre in Bezug zu den erläuterten Punkten a - c (Einfluss vom klassenspezifischen N-Terminus)?

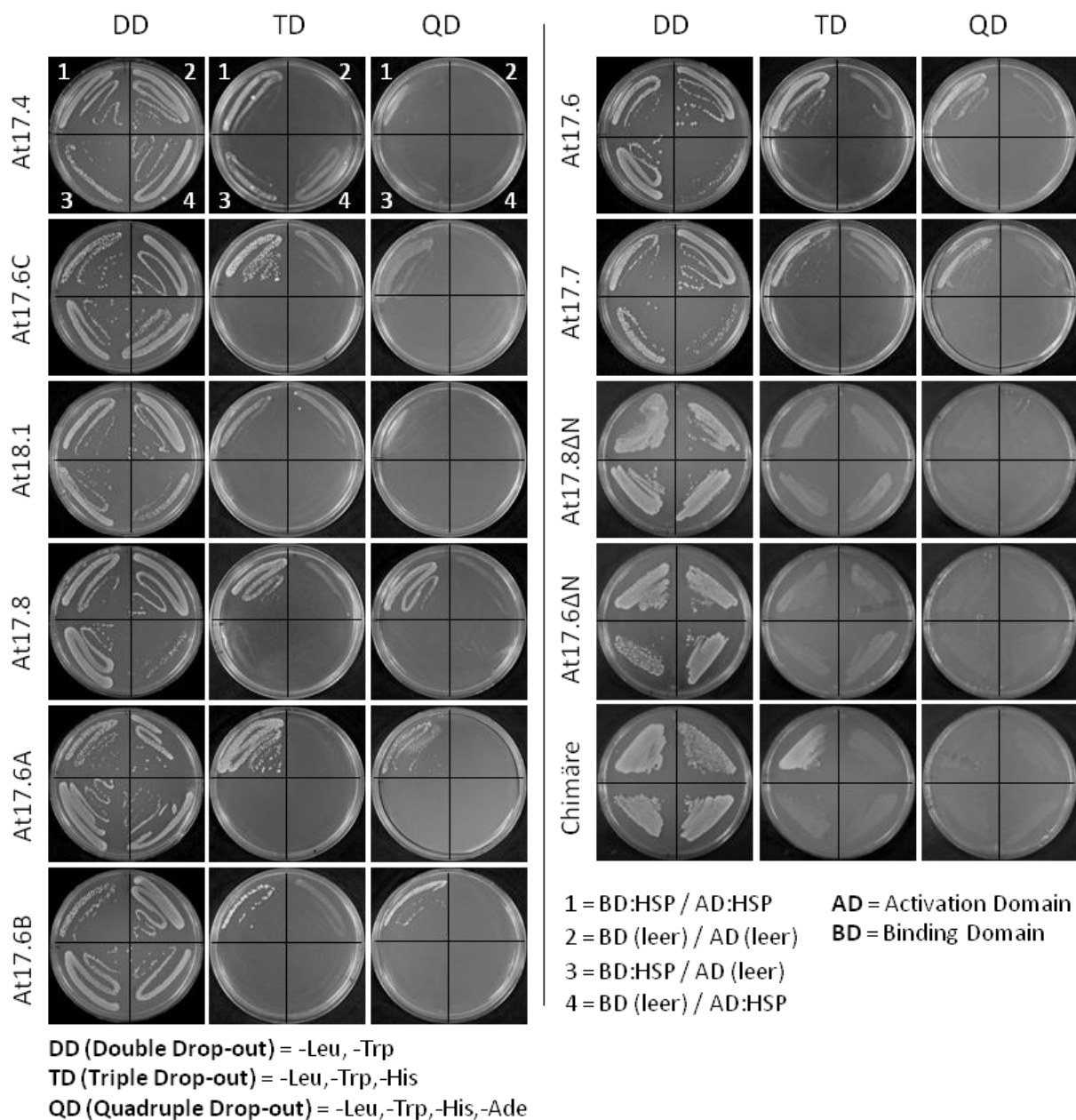


Abbildung 14: Qualitative YTH Interaktionsstudien (Voranalysen)

Die abgebildeten Proteinkombinationen wurden auf Mangelmanen mit steigender Stringenz (DD<TD<QD) ausplattiert und nach 3 Tagen Wachstum bei 30 °C dokumentiert.

Die mit Hilfe des YTH-Systems gewonnenen Ergebnisse der qualitativen und der quantitativen Analyse zeigten große Übereinstimmungen. Die Interaktionsanalyse in Bezug auf Homodimerisierung (Interaktionskombination a) erbrachte ein leicht heterogenes Ergebnis (Abbildung 14 und Abbildung 15). In allen getesteten Fällen, außer für At17.4-CI und At18.1-CI wurde Wachstum auf allen gewählten Selektionsmedien vorgefunden. At17.4-CI und At18.1-CI konnten lediglich auf dem mittel stark selektiven TD Medium wachsen. Die Analyse von mehreren Klonen aus mehreren neuen Transformationen erbrachte ein gleiches Ergebnis.

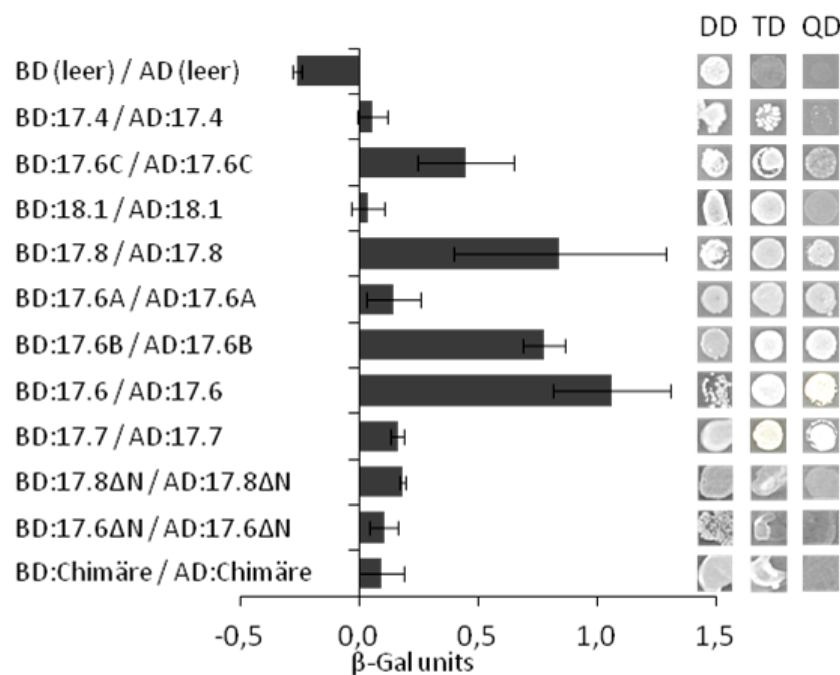
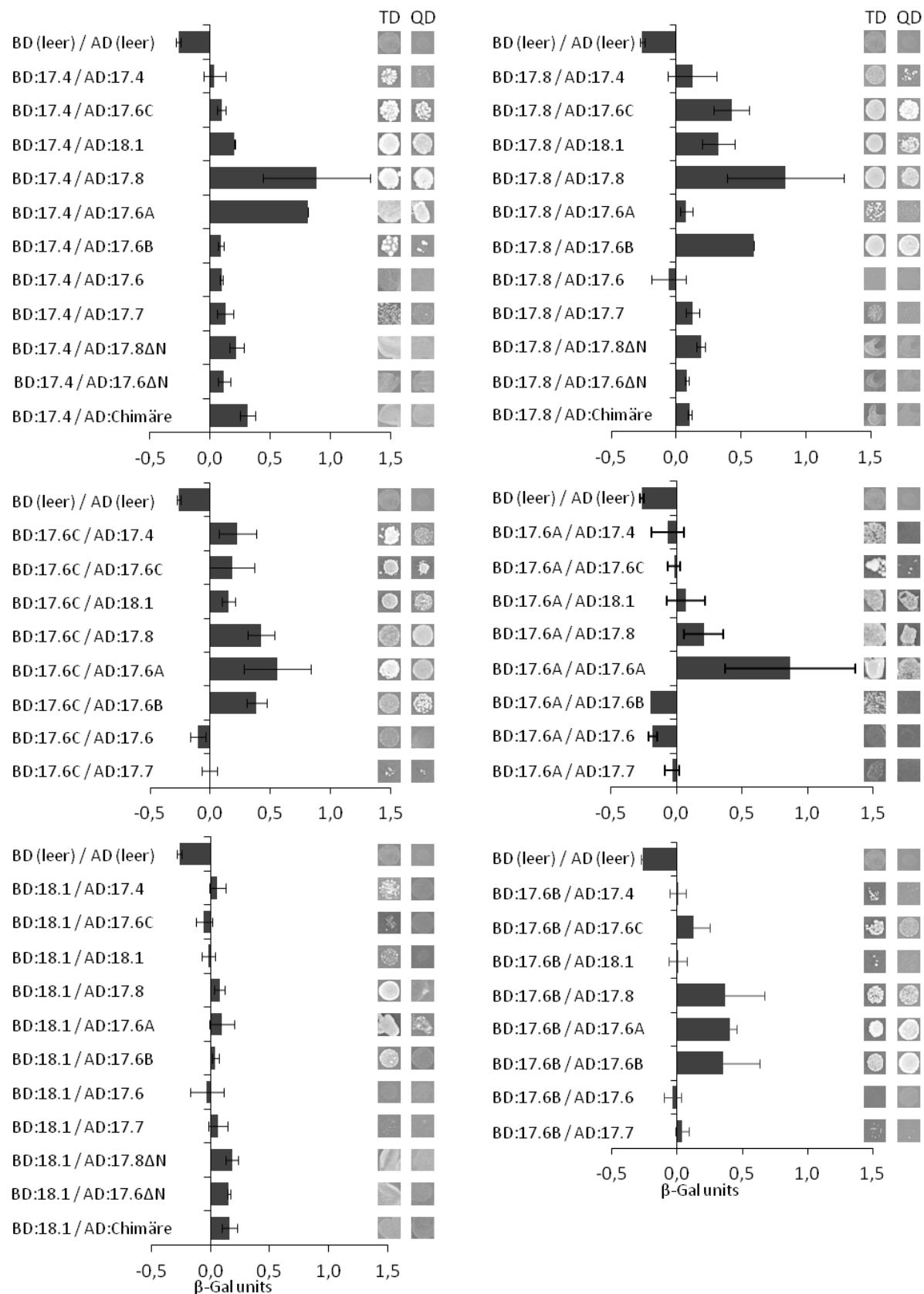


Abbildung 15: Qualitative und quantitative YTH Analyse der Homodimerisierung

Ergebnisse der Mangelmediumselektion (DD, TD, QD) sowie der ONPG-Analyse (Balkendiagramm) der angezeigten getesteten sHSP Kombinationen. Von den gezeigten Ergebnissen der ONPG-Analyse wurde die Grundaktivität (BD und AD leer) von den gezeigten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde vergleichend kontrolliert, dass die erstellten sHSP Fusionskonstrukte nicht mit der Gal4 Binde- oder der Gal4 Aktivierungsdomäne ohne angehängtes Fusionsprotein interagieren. In der parallel durchgeführten ONPG Analyse wurden die höchsten  $\beta$ -Gal Aktivitäten in den getesteten Homodimerisierungen von At17.6-CII (1,1 u), At17.6B-CI (0,8 u), At17.6C-CI (0,5 u) und At17.8-CI (0,8 u) gemessen (Abbildung 15). Niedrigere Aktivitäten wurden bei At17.4-CI (0,1 u) und At18.1-CI (0,1 u) detektiert. Die im Vergleich getesteten N-terminalen Modifikationen zeigten nur schwache Homodimerbildung (0,1 u).



Die für die negative Kontrolle erhaltenen  $\beta$ -Gal Werte dienten als Basislinie in den entsprechenden Diagrammen und wurde von den anderen erhaltenen  $\beta$ -Gal Werten abgezogen. Nun wurde getestet welche möglichen Heterodimere zwischen sHSPs innerhalb einer und zwischen den sHSPs verschiedener Klassen sich bilden könnten (Interaktionskombination b und c). Für diese Fragestellung wurden alle Klasse 1 und 2 sHSPs auf Interaktion getestet (Abbildung 16 und Abbildung 17).

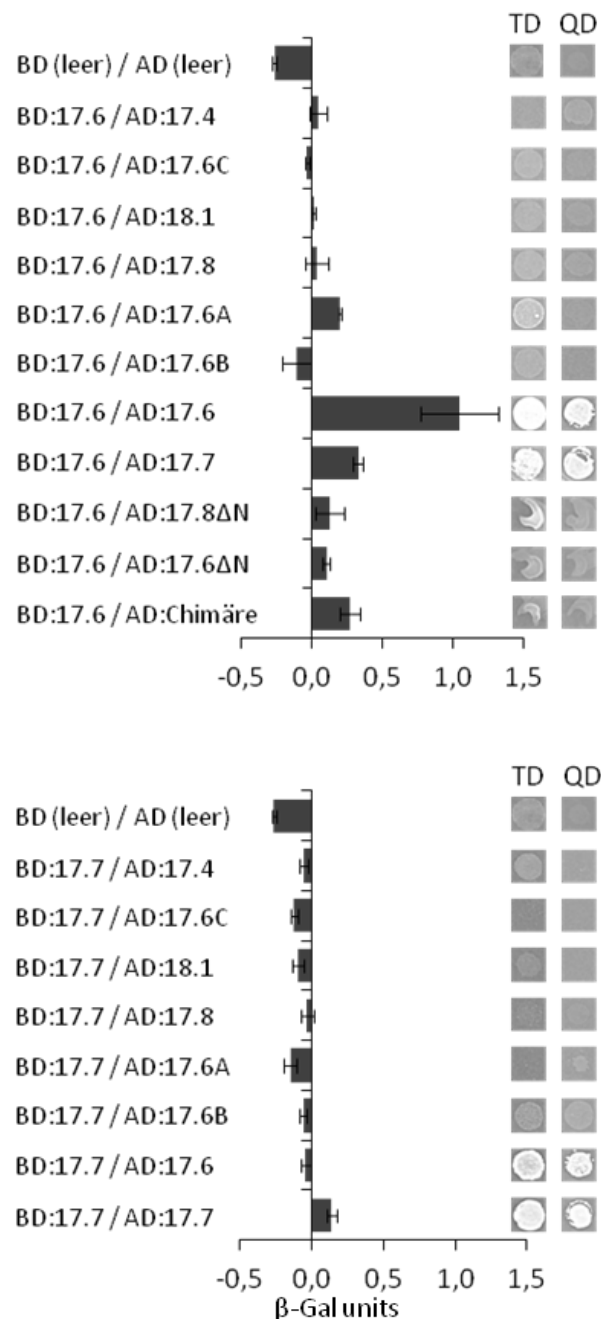


Abbildung 17: Qualitative und quantitative YTH Analyse der Klasse 2 sHSPs Dimerisierung

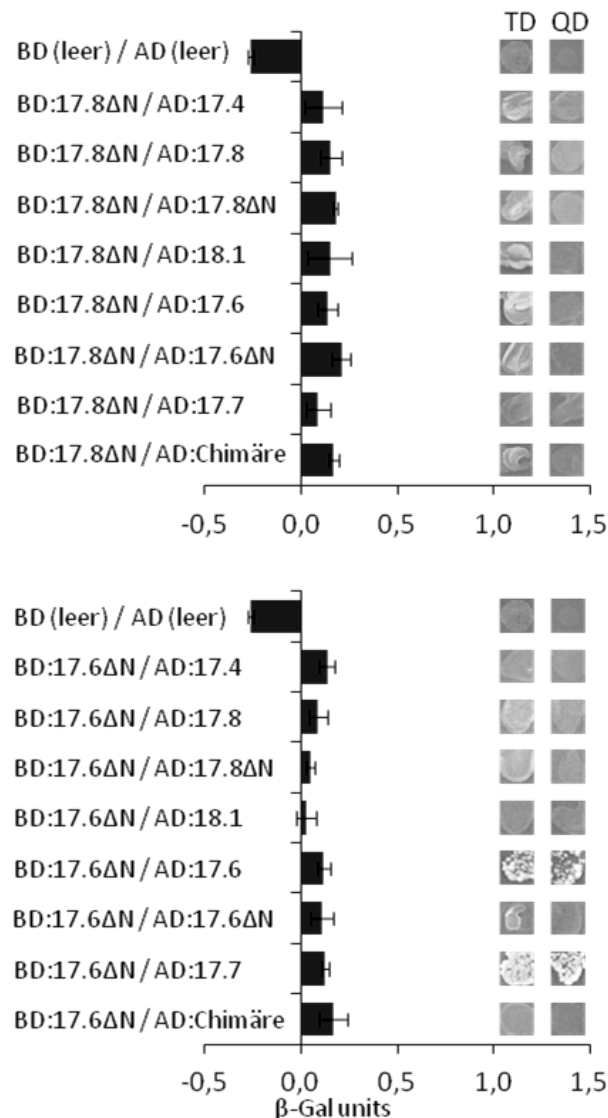
Dargestellt wurden die Ergebnisse der Mangelmediumselektion (DD, TD, QD) sowie der ONPG-Analyse (Balkendiagramm) der angezeigten getesteten sHSP Kombinationen. Von den gezeigten Ergebnissen der ONPG-Analyse wurde die Grundaktivität (BD und AD leer) von den gezeigten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Intra-klassenspezifische Heterodimerisierung betrachtend, zeigte für eine große Anzahl verschiedener getesteter sHSP-Kombinationen, Wachstum von Hefekolonien auf sehr selektiven QD Medium mit einhergehenden hohen  $\beta$ -Gal Werten. Aufgrund der Vielfalt der dokumentierten Interaktionen, sollen lediglich einige allgemeine Charakteristiken der beobachteten Interaktionen beschrieben werden. Zwei Hauptmerkmale kennzeichneten die beobachteten intra-klassenspezifischen Heterodimerisierungen. Einmal waren diese sehr vielfältig, zum anderen waren diese mit Ausnahmen (vergleiche BD:17.4 / AD:17.8 mit BD:17.4 / AD:17.4) schwächer als die für das gleiche sHSP beobachteten Homodimerisierungen. At17.6B, At17.6C und At17.8 zeigten sehr diverse Interaktionen, während At17.4 und At17.6A eher wenige oder im Fall von At18.1 generell schwache Interaktionen zeigten. Weiterhin war festzuhalten, dass in keinem der getesteten Fälle ein positiver Interaktionsnachweis (Wachstum auf QD Medium und entsprechend hohe  $\beta$ -Gal Mengen) bei einer getesteten inter-klassenspezifischen Heterodimerisierung (Interaktionskombination c) dokumentiert wurde (Abbildung 17). Eine klare Diskriminierung zwischen Klasse 1 und Klasse 2 Monomeren wurde beobachtet. Da At17.8-CI und At17.6-CII nicht nur starke Homo-, sondern auch einige starke Heterodimerisierungen nur innerhalb ihrer jeweiligen Klasse zeigten, wurden diese Sequenzen modifiziert um einige zusätzliche Fragen zu bearbeiten (Interaktionskombination d).

Es sollte untersucht werden:

- Sind Homodimerisierungen ohne klassenspezifischen N-Terminus möglich?
- Findet ohne N-Terminus weiterhin klassenspezifische Diskriminierung statt?
- Ändern sich bereits dokumentierte Interaktionen innerhalb einer Klasse?
- Welches Interaktionsmuster zeigt die inter-Klassen Chimäre?





**Abbildung 18: Qualitative und quantitative YTH Analyse der Interaktion der N-terminalen Klasse 1 und 2 Deletionen**

Dargestellt wurden die Ergebnisse der Mangelmediumselektion (DD, TD, QD) sowie der ONPG-Analyse (Balkendiagramm) der angezeigten getesteten sHSP Kombinationen. Von den gezeigten Ergebnissen der ONPG-Analyse wurde die Grundaktivität (BD und AD leer) von den gezeigten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die erstellte N-terminale Klasse 1 sHSP Deletion (At17.8ΔN) resultierte in keinem Wachstum auf stark selektiven QD Medium, unabhängig in welcher Kombination diese getestet wurde (Abbildung 18). Jedoch war schwaches Wachstum für fast alle Kombinationen auf dem nur gering selektiven TD Medium zu beobachten. Die gemessenen β-Gal Aktivitäten waren in allen Fällen gering (0,1 - 0,2 u). Der Interaktionsansatz mit der Klasse 2 Deletion (At17.6ΔN) resultierte in starkem Wachstum auf QD Medium wenn es mit einem Klasse 2 sHSP mit N-Terminus ko-exprimiert wurde. Trotzdem wurden in allen Fällen nur relativ niedrige β-Gal Aktivitäten (0,1 - 0,2 u) gemessen.

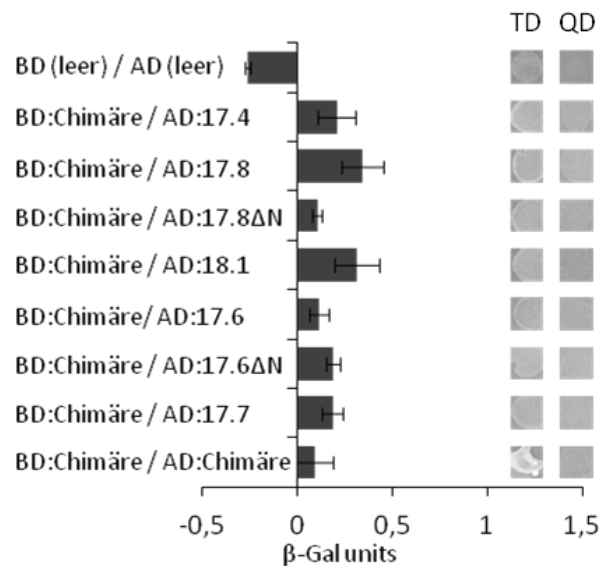


Abbildung 19: Zusammenstellung der Hefe 2-Hybrid Interaktionsanalyse der Klasse 1 und 2 Chimäre

Dargestellt wurden die Ergebnisse der Mangelmediumselektion (DD, TD, QD) sowie der ONPG-Analyse (Balkendiagramm) der angezeigten getesteten sHSP Kombinationen. Von den gezeigten Ergebnissen der ONPG-Analyse wurde die Grundaktivität (BD und AD leer) von den gezeigten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Chimäre zeigte ebenfalls kein einheitliches Bild in den vorgenommenen Analysen (Abbildung 19). Die Homodimerisierung der Chimäre resultierte in dem stärksten beobachteten Wachstum (auf TD Medium), aber nur einer schwachen Aktivierung der zellulären  $\beta$ -Gal Synthese (0,1 u). Die vergleichende ONPG Analyse zeigte, dass die Chimäre in Fällen von Klasse 1 Dimerisierungspartnern höhere  $\beta$ -Gal Aktivitäten (0,35 u) aufwies, als für Klasse 2 Dimerisierungspartner (0,2 u).

### 3.2.3 Affinitätschromatographie basierte *pull-down* Analyse

In Anlehnung zu den durchgeführten Hefe 2-Hybridanalysen sollte die Interaktion von gereinigten sHSPs getestet werden. Während im vorherigen Testsystem auf monomerer (tertiärer) Strukturebene *in vivo* Interaktionen untersucht wurden, sollten mit in *E. coli* produzierten und gereinigten sHSPs in einer Affinitätschromatographie basierten *pull-down* Analyse, *in vitro* Interaktionen auf quartärer Strukturebene untersucht werden. Auch die für die Hefeanalyse benötigten sehr langen N-terminalen Fusionen (AD- bzw. BD-Domäne mit 133 bzw. 147 AS) wurden durch einen kurzen für die schnelle Reinigung benötigten His6-Epitop mit TEV-Protease Schnittstelle (N-terminaler Anhang von 25 AS vor TEV-Protease Verdau und 4 AS nach Verdau) ausgetauscht. Das ohne Epitop gereinigte At18.1 hatte keine zusätzlichen N-terminale Sequenzen. Es wurden exemplarisch je ein sHSP der

Klasse 1 oder der Klasse 2 als Beuteprotein eingesetzt (At18.1-CI bzw. *cut*At17.6-CII) und auf Interaktion mit diversen gereinigten und an Ni-Agarose gebundenen Köderproteinen (*His*<sub>6</sub>SHSPs) getestet (Abbildung 20).

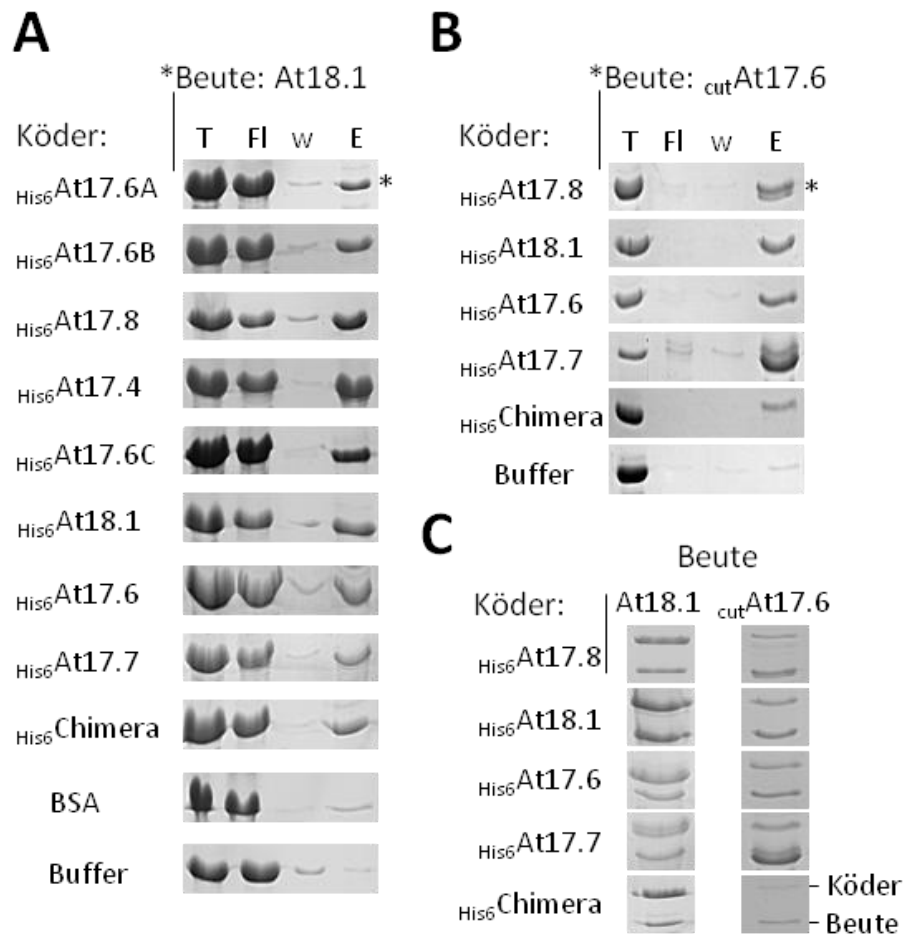


Abbildung 20: Zusammenstellung der Ergebnisse der Affinitätschromatographie basierten *pull-down* Analyse

Mit den gezeigten Köderproteinen wurde getestet ob die Beuteproteine At18.1 (A) oder *cut*At17.6 (B) gebunden werden können. Köder- und Beuteprotein wurden gemeinsam mit Ni-Agarose bei 25 °C inkubiert und in eine Säule (*Micro-spin tube*) gegossen (T). Ein Aliquot der Gesamt- (T), Durchfluss- (FI), Wasch- (w) und Eluatfraktion (E) wurde gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. (C) Zusammenstellung der Eluate zum Abschätzen der Ratio der einzelnen sHSPs in der jeweiligen Eluatfraktion.

Es wurde versucht At18.1 (A) aus einem *E. coli* Extrakt (6 h vor Ernte wurde At18.1 Expression induziert) durch Ni-Agarose gebundene *His*<sub>6</sub>sHSPs spezifisch zu isolieren, während für Experimente mit *cut*At17.6-CII (B) auf gereinigtes Protein zurückgegriffen wurde. Diese hier durchgeführte Analyse liegt dem Prinzip zu Grunde, dass *His*<sub>6</sub>-Epitop tragende sHSPs an Ni-Agarose binden sollten, während die Epitop befreiten sHSPs (At18.1-CI bzw. *cut*At17.6-CII) nicht. Wurde At18.1 oder *cut*At17.6-CII mit Puffer oder BSA versetzt und mit Ni-Agarose inkubiert, so war kein oder nur eine äußerst geringe Menge an betreffendem Protein in der Eluatfraktion zu finden. Der größte Teil hatte nicht an die Ni-Agarose gebunden und war im Durchfluss zu finden

(At18.1). Bei  $\text{cutAt17.6-CII}$  war das betreffende Protein nicht im Durchfluss zu beobachten, da durch die verwendete Methode das sHSP unter die Coomassie Detektionsgrenze verdünnt wurde. Als positive Kontrolle wurde die zu erwartende Interaktion von Epitop-freiem sHSP mit seinem His6-Epitop versehenem Partner getestet. In beiden Fällen, für At18.1 und  $\text{His6At18.1}$  sowie für  $\text{cutAt17.6-CII}$  und  $\text{His6At17.6-CII}$ , war ein intensives Signal in den jeweiligen Eluatfraktionen zu finden. Die Analyse zeigte, dass alle getesteten sHSP Kombinationen, unabhängig der Klassenzugehörigkeit der jeweiligen zu testenden Interaktionspartner, zu einer Zunahme des Beuteproteins in der Eluatfraktion führten. Interaktionsanalysen mit der  $\text{His6Chimäre}$  resultierten in einer Zunahme von At18.1-CI bzw.  $\text{cutAt17.6-CII}$  in der Eluatfraktion, wenn auch in leicht geringerem Maße. Eine Zusammenstellung der eluierten Proteinanteile (C) ließ eine 1:1 bis 1:2 Interaktionsratio vermuten. Eine klassenspezifische Diskriminierung wie in der Hefe 2-Hybrid Analyse konnte nicht beobachtet werden.

### 3.2.4 CD-Spektroskopische Analysen einiger sHSP-Interaktionen

Da für verschiedene sHSP-Kombinationen Interaktionen auf verschiedenen strukturellen Ebenen nachgewiesen werden konnten, wurden einige sHSP-Kombinationen einer CD-Spektroskopischen Analyse unterzogen.

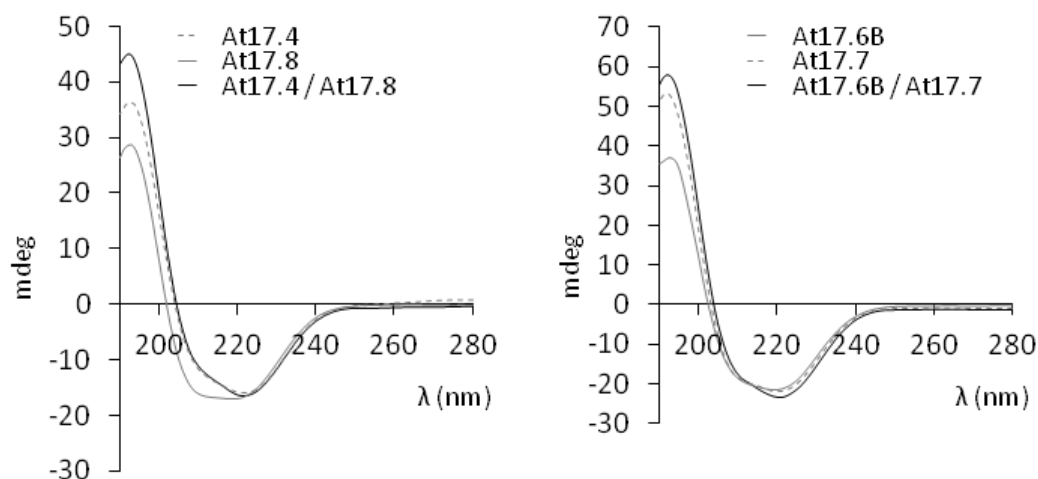


Abbildung 21: Exemplarische CD-spektroskopische Strukturanalyse von sHSP Interaktionen

Von den jeweilig angezeigten sHSPs wurden mit äquimolaren Mengen erst Einzelmessungen durchgeführt, bevor die jeweiligen sHSPs in einer 1:1 Ratio zusammen gemessen wurden. Gemessen wurde bei 25 °C.

Sollten sHSP-Interaktionen Verlagerungen in der Sekundärstruktur hervorrufen, so würden diese messbar sein. Äquimolare Mengen an angezeigten sHSPs wurden

einzelnen und gemischt bei 25 °C gemessen. Die gemessenen Spektren unterschieden sich nicht im Wesentlichen von den gemessenen Einzelspektren (Abbildung 21). Es konnten keine größeren Strukturverschiebungen beobachtet werden, so dass nur einzelne Beispiele gezeigt wurden.

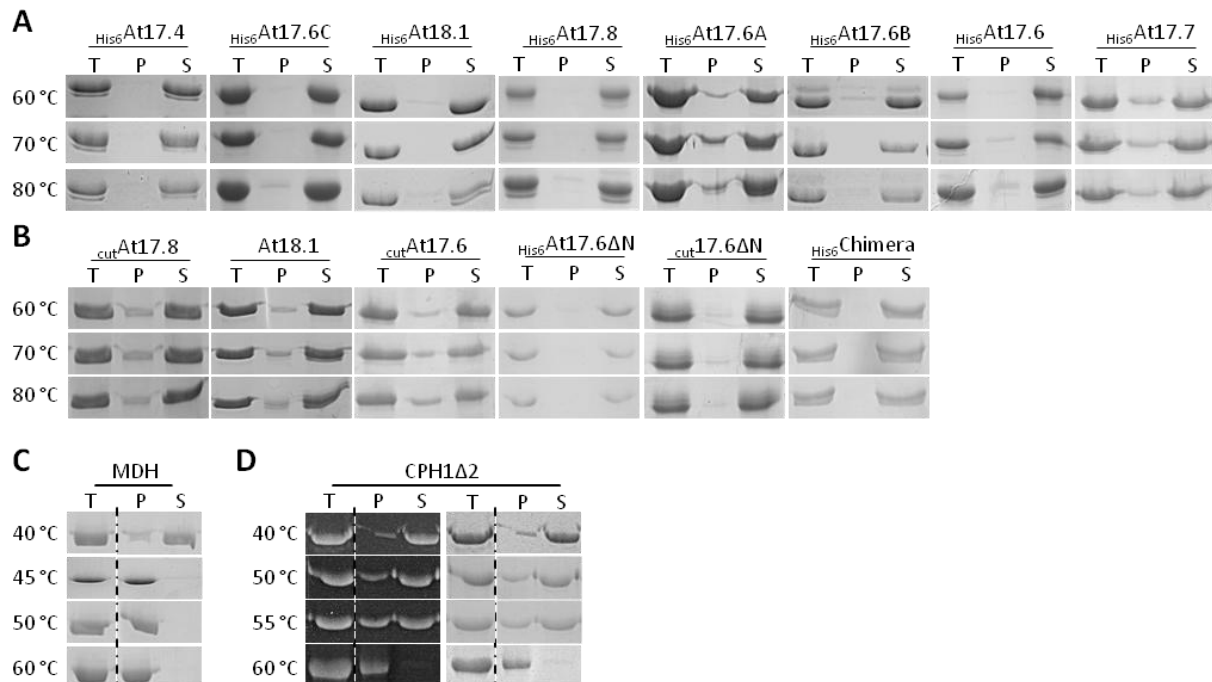
### **3.3 Vergleichende Strukturanalyse bei verschiedenen Temperaturen**

Dieses Unterkapitel fasst die erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Temperatur auf verschiedene Parameter der zu untersuchenden Proteine zusammen. Zuerst wurde die allgemeine durch Temperatur induzierbare Proteinaggregation miteinander verglichen bevor der Einfluss auf verschiedene, für Proteine differenzierbare, strukturelle Ebenen (Sekundär- und Quartär-Struktur) untersucht wurde.

#### **3.3.1 Analyse der Proteinaggregation (Löslichkeit) bei hohen Temperaturen**

In *E. coli* produzierte und Affinitätschromatographie gereinigte <sub>His6</sub>sHSPs wurden bezüglich ihrer Löslichkeit bei verschiedenen Temperaturen getestet (Abbildung 22A). Es wurden ein Aliquot von ~4 µg je sHSP für 1 h bei angegebener Temperatur inkubiert und im Anschluss in Pellet (P) und lösliche Fraktion (S) separiert. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit einem Aliquot der gleichen Menge an unbehandeltem Protein (T) verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass nur ein geringer Teil der eingesetzten Proteinmenge präzipitierte (aggregierte) und daher im Pellet zu finden war. Bei allen getesteten Temperaturen (60 - 80 °C) verblieb der Hauptteil löslich und im Überstand (S). Die verschiedenen erstellten sHSP Modifikationen (Deletionskonstrukte, Chimäre sowie TEV-Protease geschnittene sHSPs, wie auch das sHSP ohne Epitop) wurden der gleichen Analyse unterzogen und zeigten gleiche Hitzestabilität (Abbildung 22B). Vergleichend wurde die Löslichkeit von MDH und CPH1Δ2 bei verschiedenen Temperaturen getestet. Ab einer Temperatur zwischen 40 - 50 °C war keine MDH im löslichen Überstand zu finden (Abbildung 22C). Eine genauere Analyse zeigte, dass 45 °C für eine

quantitative MDH Präzipitation ausreichen. Als weiteres Protein wurde CPH1Δ2 untersucht (Abbildung 22D).



**Abbildung 22:** Analyse der Proteinaggregation der zu untersuchenden Proteine bei erhöhten Temperaturen.

Die gereinigten sHSPs (A), sowie deren Modifikationen (B) wurden bei den angegebenen Temperaturen für 1 h inkubiert bevor sie zentrifugiert wurden. Vor der Inkubation wurde ein Aliquot als Ladekontrolle (T) entnommen. Die erhaltene Pellet Fraktion (P) wurde vergleichend zum entsprechenden Überstand (S) und der Ladekontrolle geladen und mittels SDS-PAGE separiert. Die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Klient-Proteine MDH (C) und CPH1Δ2 (D) wurden auf dieselbe Weise untersucht.

Die Bestimmung der temperaturbedingten irreversiblen Löslichkeitsgrenze zeigte, dass CPH1Δ2 ab 50 - 60 °C denaturierte und somit thermisch etwas stabiler als MDH ist. Eine genauere Eingrenzung der Denaturierungstemperatur zeigte, dass ab 50 °C die Denaturierung einsetzte, bei 55 °C weiter voranschritt und bei 60 °C komplett war (bei 1 h Inkubation).

### 3.3.2 CD-Spektroskopische Sekundärstrukturanalyse

Nachdem festgestellt wurde, dass alle sHSPs auch bei sehr hohen Temperaturen löslich blieben, wurde mittels CD-Spektroskopie die Lichtdrehung (Elliptizität in *milli degrees*) der einzelnen sHSPs zwischen 190 - 280 nm bei 25 °C und schrittweise um 10 °C erhöhten Temperaturen (bis 80 °C) gemessen (Abbildung 23). Es erfolgte eine weitere Messung, nachdem die untersuchte Probe Temperaturen unter 30 °C für 10 min erreicht hatte (*Recovery*).

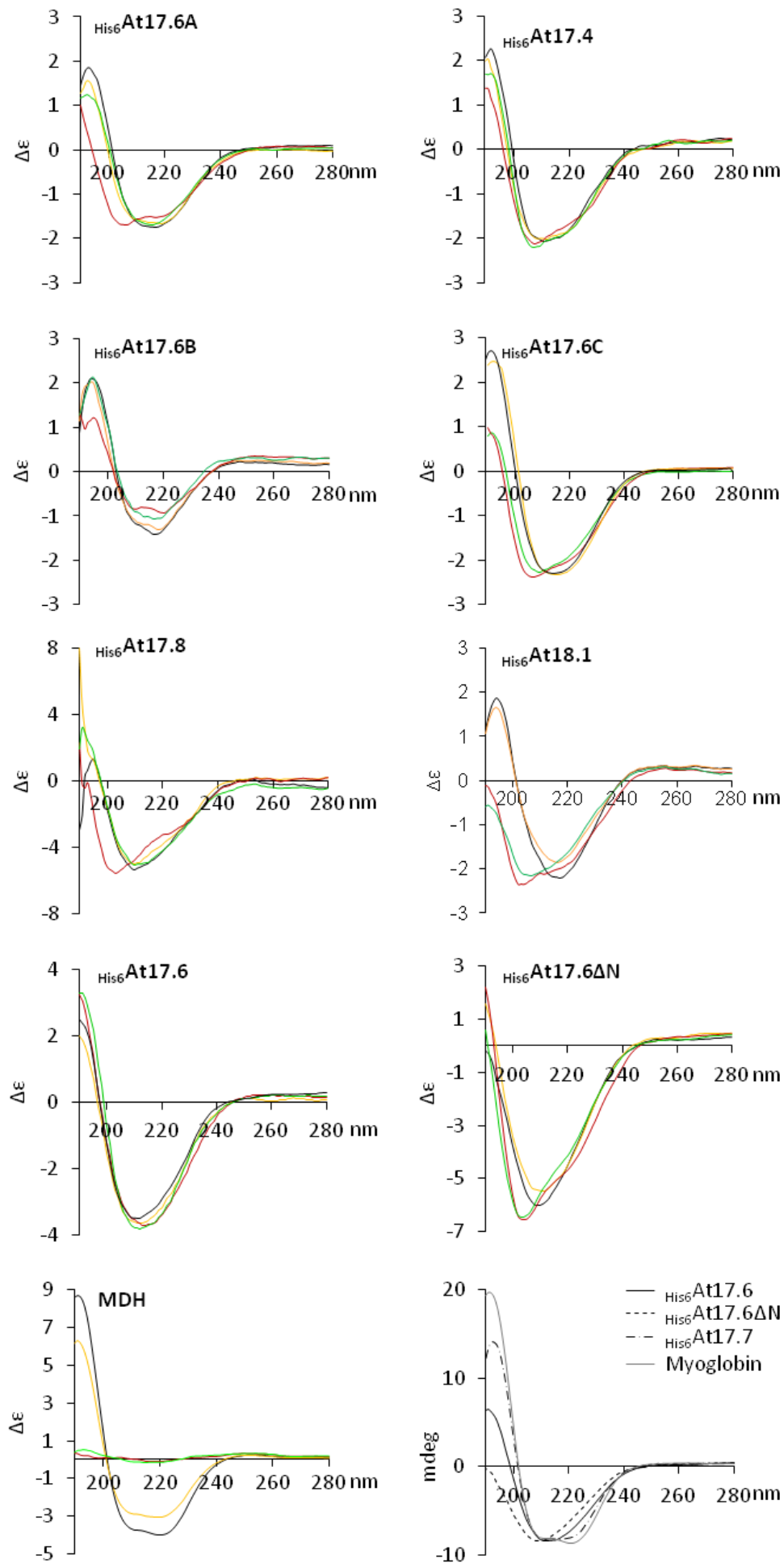


Abbildung 23: CD-Spektroskopische Strukturanalyse der gereinigten His6SHSPs bei verschiedenen Temperaturen

Von jedem zu untersuchendem sHSP wurde ein Spektrum bei verschiedenen Temperaturen (schwarze Linie = 30 °C, gelbe Linie = 40 °C, rote Linie = 80 °C, grüne Linie = 80 °C mit anschließend 10 min <30 °C) gemessen. MDH diente als Beispiel einer irreversiblen Denaturierung. Myoglobin wurde als Vergleich für ein helikales Protein herangezogen.  $\Delta\epsilon$  wurde berechnet nach (Lobley et al., 2002; Whitmore and Wallace, 2004, 2008).

Die vergleichende Betrachtung der bei 25 °C gemessenen CD-Spektren zeigte verschiedene Auffälligkeiten. Die erhaltenen Spektren waren sehr divers, so dass die untersuchten sHSPs nicht allein aufgrund der erhaltenen Spektren einer Klasse zu zuordnen waren. Myoglobin wurde als  $\alpha$ -helikales Vergleichsprotein herangezogen, da es hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht und keine  $\beta$ -Faltblätter enthält (Kendrew et al., 1958). Während das  $\alpha$ -helikale Vergleichsprotein Myoglobin zwei deutlich voneinander unterscheidbare negative Minima hatte (210 und 224 nm), zeigten die Myoglobin ähnlichen sHSP Spektren ( $_{\text{His6}}\text{At17.4-Cl}$ ,  $_{\text{His6}}\text{At17.6B-Cl}$ ,  $_{\text{His6}}\text{At17.7-CII}$ ) meist nur ein sehr gedehntes Minimum-Plateau in diesem Bereich. Die restlichen sHSPs zeigten ein deutliches Minimum zwischen 212 - 215 nm. Messungen der Klasse 2 Deletion ( $_{\text{His6}}\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$ ) resultierten in einer weiteren leichten Verschiebung des negativen Minimums zu kürzeren Wellenlängen (210 nm). Die bei allen sHSPs der Klassen 1 und 2 vorhandene positive Lichtdrehung unterhalb von 200 nm fehlte bei diesem gemessenen CD-Spektrum.

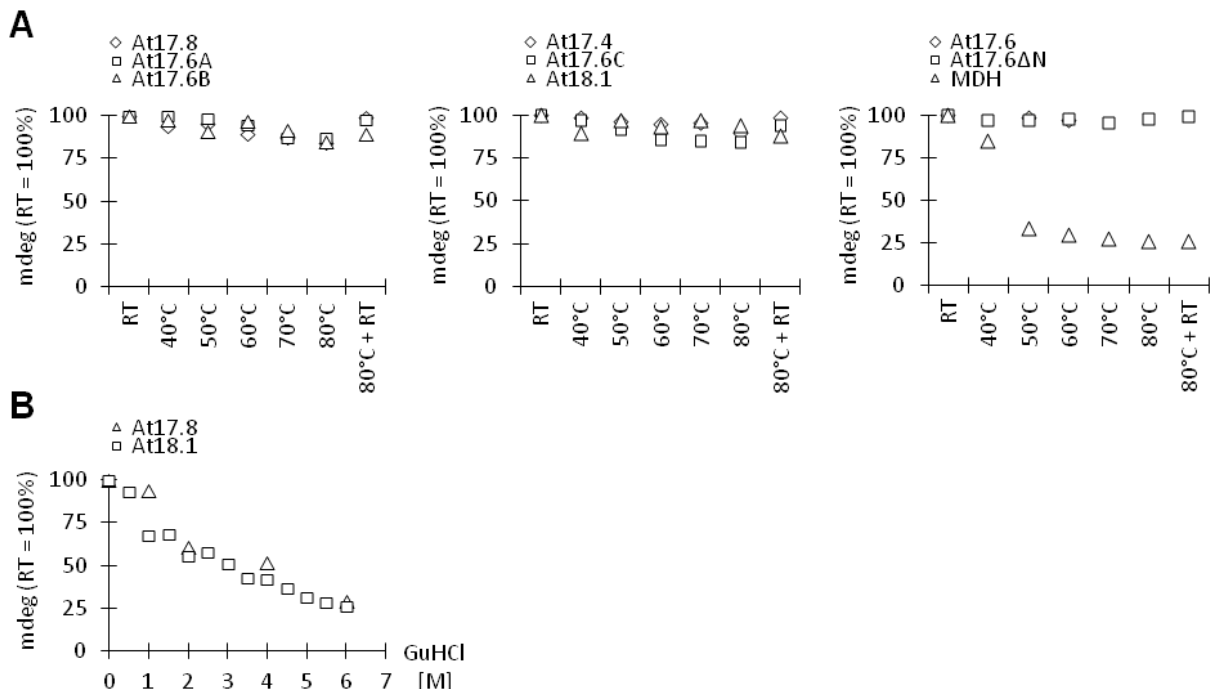


Abbildung 24: Abnahme der optischen Rotation bei 220 nm unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen

(A) Zum besseren Vergleich wurden die lichtdrehenden Strukturen bei einer Wellenlänge (220 nm) und Temperatur (RT = 25 °C) dokumentiert und ihre Abnahme bei höheren Temperaturen dazu in Relation gesetzt (25 °C = 100%). MDH diente als thermisch labiles Vergleichsprotein. Die chemische GuHCl induzierte Denaturierung zweier exemplarisch ausgewählter sHSPs (B) diente als Vergleich zur temperaturinduzierten Denaturierung.



Die durchgeführten Temperaturerhöhungen führten zu leichten Änderungen der gemessenen sHSP Spektren (Abbildung 23). Allgemein betrachtet waren Verschiebungen bei 80 °C in fast allen Spektren zu beobachten, außer bei  $\text{His6At17.4}$  und  $\text{His6At17.6}$  in nur geringerem Maße. Für  $\text{His6At17.6C}$ ,  $\text{His6At18.1}$  und  $\text{His6At17.6}\Delta\text{N}$  waren die beobachteten Verschiebungen unter *Recovery* Bedingungen nicht reversibel. MDH als Denaturierungsindikator zeigte bei erhöhten Temperaturen (ab 40 °C) eine deutliche Abnahme der Lichtdrehung, welche auch nach Zurücksetzen der Probe auf 25 °C sich nicht wieder ausprägte. In Abbildung 24 wurden die erhaltenen Denaturierungsergebnisse übersichtlich zusammengefasst. Da helikale Strukturen besonders bei 220 nm drehen (siehe Myoglobin) und diese instabiler als Faltblattstrukturen sind, wurde in der Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse diese Wellenlänge ausgesucht. Ein Denaturierungsansatz mit GuHCl zeigte (Abbildung 24B), dass sHSPs chemisch denaturiert werden können, sich jedoch bei den von uns getesteten Temperaturbedingungen stabil verhalten.

### 3.3.3 bis-ANS Untersuchungen zu Oberflächendynamiken

Zur Untersuchung möglicher Temperatur induzierter Umlagerungen der sHSP Oberfläche wurde eine bis-ANS Bindungsstudie durchgeführt. bis-ANS ist eine Chemikalie, welche nach Bindung an hydrophobe Oberflächen durch Fluoreszenz nachweisbar ist. Das bis-ANS Bindungsverhalten von sHSPs bei verschiedenen Temperaturen wurde bereits häufig verwendet, um durch Temperatur induzierte Änderungen der Oberflächenstruktur / Hydrophobizität zu untersuchen (Lee et al., 1997; Torok et al., 2001). Es wurden alle gereinigten sHSPs hinsichtlich ihres bis-ANS Bindungsverhaltens bei verschiedenen Temperaturen (25, 37, 45 und 55 °C) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass  $\text{His6sHSPs}$  das zugegebene bis-ANS unabhängig der gewählten Temperatur binden (Abbildung 25A).  $\text{His6At17.7-CII}$ ,  $\text{His6At17.6C-CI}$  und  $\text{His6At17.6B-CI}$  zeigten relativ schwache bis-ANS Fluoreszenz, während alle anderen  $\text{His6sHSPs}$  intensivere bis-ANS Fluoreszenz aufwiesen. Das exemplarische Entfernen eines Klasse 2 N-Terminus ( $\text{His6At17.6}\Delta\text{N-CII}$ ) führte zu keiner Abnahme der beobachteten Fluoreszenz. Hingegen führte das Entfernen des His6-Epitops bei beiden gereinigten Proteinen ( $\text{cutAt17.6}\Delta\text{N-CII}$  und  $\text{cutAt17.6-CII}$ ) zu

einer deutlichen Abnahme der dokumentierten bis-ANS Fluoreszenz im Vergleich zu ihren nicht geschnittenen Proteinversionen.

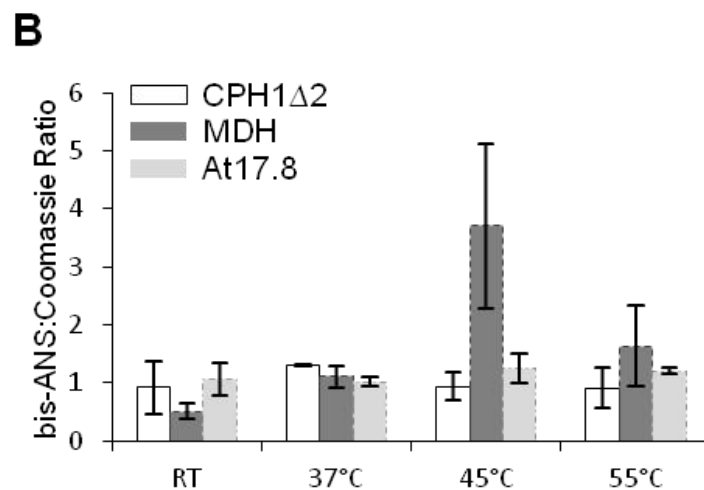
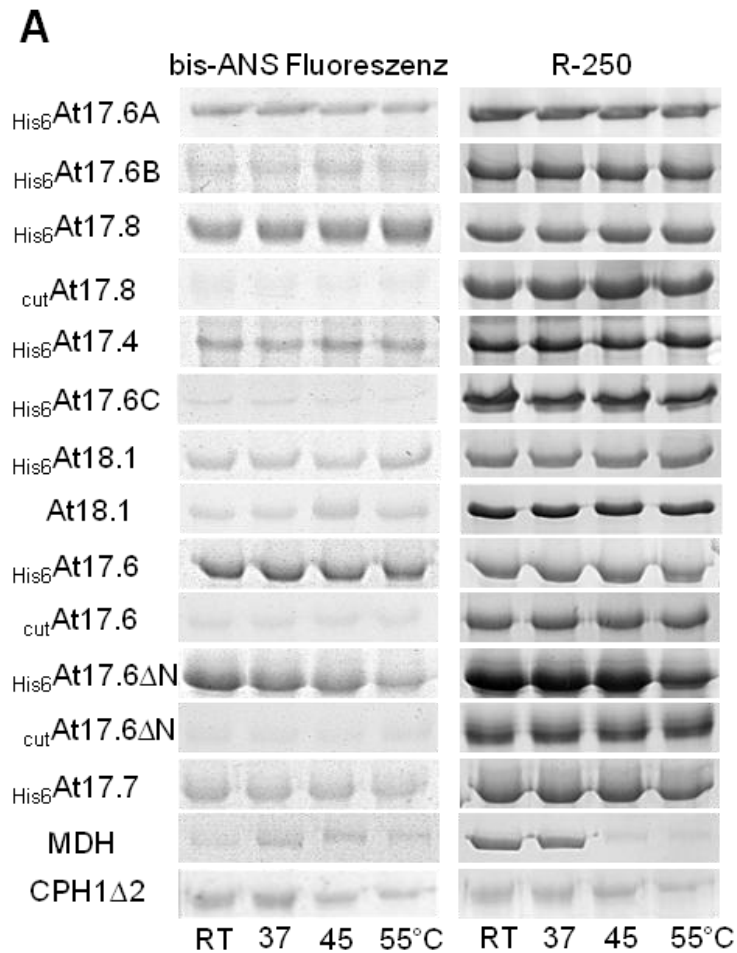


Abbildung 25: bis-ANS Bindungsanalysen bei verschiedenen Temperaturen

(A) Die ausgewählten Proteine wurden wie beschrieben vorbereitet und mittels SDS-PAGE getrennt. bis-ANS Fluoreszenz und Coomassie Färbung wurden dokumentiert, sowie deren Intensitäten gemessen (Quantity One Software). Anhand dieser wurde die Ratio der bis-ANS Fluoreszenz zu Coomassie Signalintensitäten berechnet und in einem Diagramm vergleichend dargestellt (B). Die Fehlerbalken präsentieren den Standardfehler der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Ergebnisse von His6 At17.8 wurden vergleichend dargestellt.

Ähnliches Verhalten zeigte sich bei sHSPs der Klasse 1, exemplarisch dokumentiert an <sup>His6</sup>At17.8-CI und <sup>cut</sup>At17.8-CI. Einzig das ohne Epitop gereinigte At18.1 zeigte ein mit Temperatur steigendes bis-ANS Bindungsverhalten, zu erkennen an der stetig steigenden Intensität der Fluoreszenz. Bei 45 °C war das Signal am intensivsten und nahm bei 55 °C in Intensität leicht ab. MDH zeigte ebenfalls einen Anstieg der bis-ANS Fluoreszenz bis 45 °C, wiederum gefolgt von einem leichten Abfallen bei 55 °C. Während die sHSPs nach allen Temperaturvorbehandlungen in konstant gleicher Menge aufgetrennt wurden, verschwand der Coomassie gefärbte MDH Anteil bei Temperaturen ab 45 °C. Die Berechnung der bis-ANS Intensität zu Coomassie Intensität Ratio verdeutlicht die Steigerung der bis-ANS Bindung von MDH bei erhöhten Temperaturen (Abbildung 25B). Durch das Abfallen der Coomassie Signalintensität bei 45 °C (Abbildung 25A), fällt die vorhandene bis-ANS Fluoreszenz Intensität bei der Berechnung der bis-ANS Intensität zu Coomassie Intensität Ratio stärker ins Gewicht (Abbildung 25B). CPH1Δ2 zeigte bei allen Temperaturen hohe bis-ANS Bindung unter getesteten Tageslichtbedingungen, wobei jedoch eine Eigenfluoreszenz des Chromophors nicht ausgeschlossen werden konnte. Anregungswellenlänge von bis-ANS und Absorption von CPH1Δ2 überlappen in diesem Bereich (314 nm; siehe CPH1Δ2 Spektren in Einleitung oder Ergebnisteil).

### 3.3.4 Quartäre Strukturanalyse mittels Blue Native PAGE und SEC

Alle gereinigten Klasse 1 und 2 sHSPs sowie deren Modifikationen wurden auf ihre native quartäre *in vitro* Struktur untersucht. Es wurde jeweils ein sHSP pro *Blue Native* Gel in aufsteigenden Mengen (0.3 - 6 µM) geladen und unter ausgewählten konstanten Temperaturen (4, 25 und 45 °C) elektrophoretisch getrennt. Jeweils die beste zueinander vergleichbare Konzentration pro sHSP-Ansatz wurde gezeigt (Abbildung 26). Der Einfluss von sogenannten *Recovery* Bedingungen auf die sHSP-Struktur wurde simuliert, indem die zu testenden Proteine erst bei 45 °C für 1 h inkubiert wurden, bevor sie bei 25 °C elektrophoretisch getrennt wurden. Vergleichend zur nativen Gelelektrophorese wurden Gelfiltrationsexperimente mit einer Superdex200 10/300 Säule mit einem vergleichbaren Trennbereich (~1.000-10 kDa) durchgeführt (Abbildung 26, rechte Spalte). Da keine kontrollierte Steuerung der Säulentemperatur möglich war, wurden die Proben bei 25 °C separiert. Die

verwendete Säule wurden mit den Eichproteinen Thyroglobin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (240 kDa), BSA (60 kDa), Karboanhydrase (30 kDa) und Myoglobin (17 kDa) geeicht, welche auch im BN-PAGE Marker Mix verwendet wurden.

Die mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennten sHSPs zeigten untereinander verschiedene Größen bei 25 °C. Weiterhin zeigte sich bei manchen sHSPs eine temperaturabhängig Verschiebung der beobachteten Proteinkomplexe in nieder- oder höher molekulare Trennbereiche.

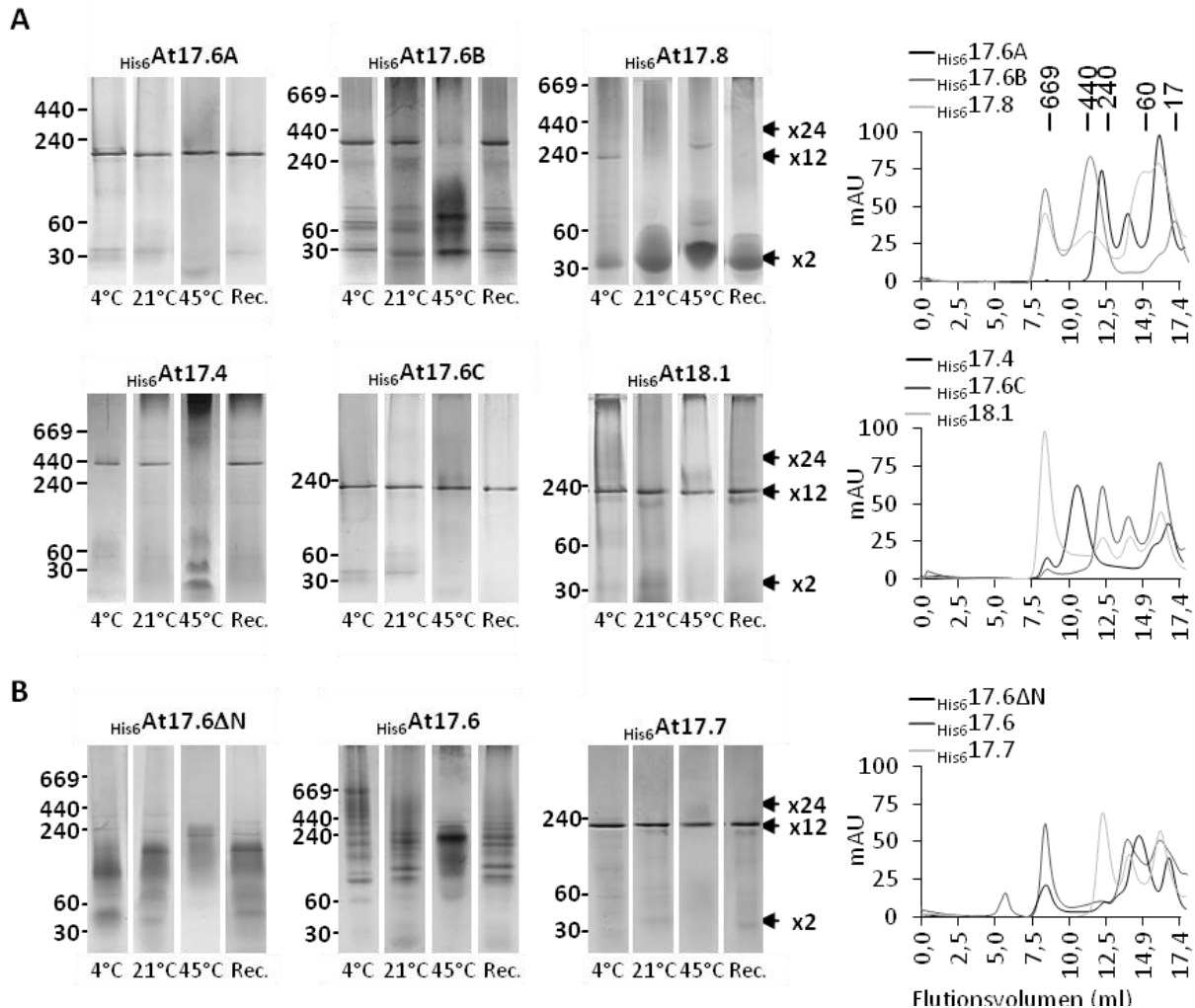


Abbildung 26: Quartärstrukturanalyse mittels Blue Native PAGE und SEC

Klasse I (A) und Klasse II (B) sHSPs wurden bei angezeigter Temperatur mittels BN PAGE separiert und Coomassie gefärbt. Die dazugehörigen SEC Profile bei RT wurden jeweils rechts angefügt.

Es waren im fast kompletten Trennungsbereich der nativen Gelelektrophorese (~10 – 1.000 kDa) sHSP Komplexe zu finden, wobei sich einige Eigenheiten zusammenfassen ließen. Die sHSPs His6At17.6A-CI, His6At17.6C-CI, His6At17.7-CII zeigten in einem Temperaturbereich bis 45 °C jeweils nur ein Signal bei ca. 240 kDa. Bei 4 °C und 25 °C separierten His6At17.4-CI und His6At17.6B-CI ebenfalls als einzelner Komplex bei ungefähr 300 - 440 kDa. Dieser dissoziierte bei 45 °C in

niedermolekulare Komplexe (30 und 60 kDa). Generell waren die beobachteten Dissoziationen reversibel wenn die hitzebehandelte (45 °C) Proteinprobe bei 25 °C separiert wurde (*Rec.*).

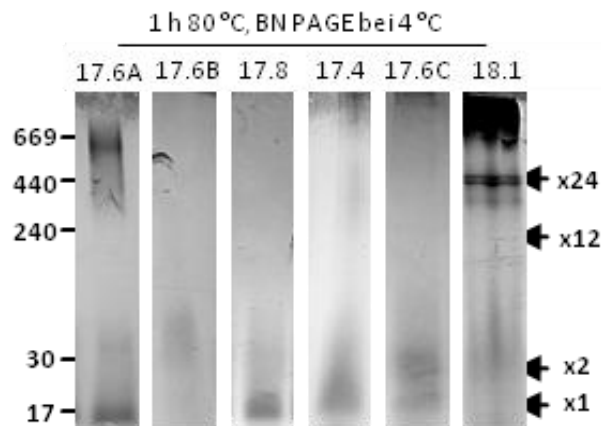


Abbildung 27: Quartäre Strukturanalyse 80 °C vorbehandelter sHSPs mittels Blue Native PAGE

*His6*sHSPs wurden für 1 h bei 80 °C vorbehandelt, bevor sie bei 4 °C mittels BN PAGE getrennt wurden.

Bei den bisherigen Analysen waren alle sHSPs bis 80 °C stabil/löslich und zeigten keine größeren Änderungen der sekundären Struktur. In einem dazu vergleichenden Experiment wurde die quartäre Struktur von 80 °C vorbehandelten sHSPs mittels BN PAGE analysiert (Abbildung 27). Die Vorbehandlung bei 80 °C führte zu einem verschwinden der vorher beobachteten Oligomere, so dass hauptsächlich Dimere und Monomere gefunden wurden. *His6*17.6A und *His6*At18.1 zeigten zusätzlich Reste nicht dissoziierter oder auch neu assemblierter oligomerer Formen im molekularen Trennbereich zwischen 440 - 1.000 kDa.

Die zu ihren Modifikationen in vergleichender Weise analysierten sHSPs (At17.8, At18.1, At17.6) zeigten teilweise sehr vielfältige Unterschiede, so dass sie nachfolgend einzeln beschrieben wurden. At18.1 separierte bei 4 °C in zwei separaten Komplexen, je einer bei ~230 und einer bei ~450 kDa (Abbildung 28). Der auf Höhe von 230 kDa beobachtete Komplex, dissoziierte bei RT in verschiedene niedrigere molekulare Komplexe. Wurde At18.1 bei 45 °C getrennt, dissoziierten alle bei 25 °C beobachteten Komplexe zu einem niedrigmolekularen Komplex bei ~30 kDa. Unter *Recovery* Bedingungen getrennt zeigte At18.1 gleiches Verteilungsmuster wie unter 25 °C Bedingungen. *His6*At18.1-Cl separierte als ein temperaturstabiler Komplex (bis 45 °C) bei ca. 220 kDa.

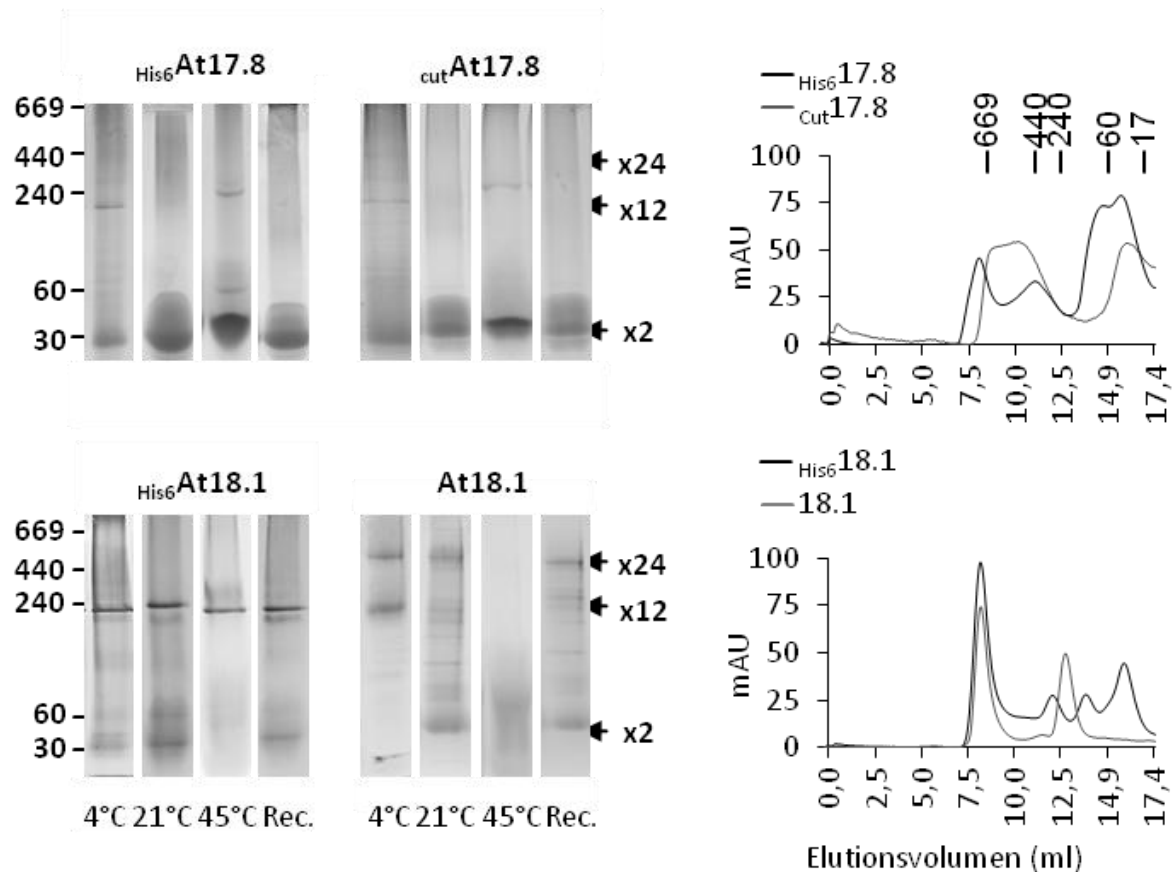
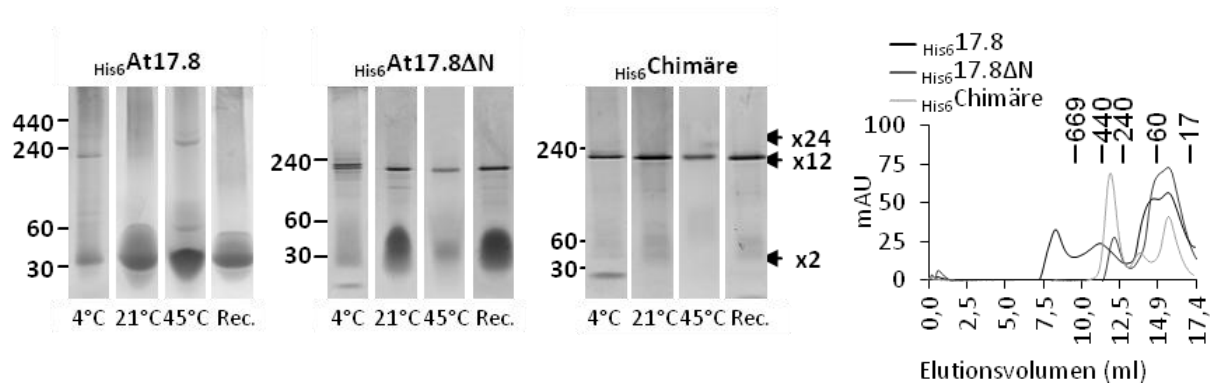


Abbildung 28: Quartäre Strukturanalyse von N-Terminal His6-Epitoptragenden Klasse 1 sHSPs im Vergleich zu ihren nativen Versionen

His6sHSPs wurden vergleichend zu TEV geschnittenen sHSPs mittels BN PAGE bei angezeigten Temperaturen separiert. Ein von vorherin ohne Modifikationen gereinigtes sHSP (At18.1) wurde zusätzlich mit seiner His6-Epitop versehenen Version verglichen. Entsprechende SEC Profile bei RT wurden jeweils rechts angefügt.

Das mit Epitop versehene His6At17.8-CI, sowie das geschnittene cutAt17.8-CI zeigten keine Unterschiede zueinander, dafür unterschieden sie sich von allen anderen untersuchten sHSPs. Bei 21 °C und *Recovery* Bedingungen separierten diese Proteinvarianten jeweils als niedrigmolekularer Komplex bei ~35 kDa. Bei 4 °C und 45 °C bildete sich neben dem niedrigmolekularen Komplex zusätzlich ein höher molekularer Komplex zwischen ~200 - 440 kDa. Deletion des betreffenden Klasse 1 N-Terminus (His6At17.8ΔN<sub>1-43</sub>-CI) führte zu einer von Temperatur unabhängigen Zunahme des Signals bei 240 kDa (Abbildung 29). Jedoch lagen bei 25 °C und *Recovery* Bedingungen ein größerer Teil als niedrigmolekularer Komplex bei ~30 kDa vor, verglichen zu 4 °C und 45 °C. Die Addition eines Klasse 2 N-Terminus (At17.6N<sub>1-41</sub>) an die N-terminale Deletion des Klasse 1 sHSPs (At17.8ΔN<sub>43-158</sub>) führte zu einem stabilen bis 45 °C nicht dissoziierenden Komplex bei ~240 kDa (His6Chimere = His6At17.6N<sub>1-41</sub>:At17.8ΔN<sub>1-43</sub>-CI).



**Abbildung 29: Quartärstrukturanalyse mittels Blue Native PAGE und SEC**

Es wurden die Ergebnisse der schrittweisen Umstrukturierung des Klasse I N-Terminus zu einem Klasse II N-Terminus vergleichend dargestellt. Die dazugehörigen SEC Profile bei RT wurden jeweils rechts angefügt.

Beim Vergleich der beiden Klasse 2 Mitglieder war festzustellen, dass  $\text{His}_6\text{At17.7-CII}$  bis 45 °C nicht dissoziierte, während  $\text{His}_6\text{At17.6-CII}$  ein temperaturabhängiges Verteilungsmuster aufwies (Abbildung 26B und Abbildung 30). Bei 4 °C separierte  $\text{His}_6\text{At17.6-CII}$  in bis zu ~18 unterscheidbare Komplexe welche zwischen 35 und 1.000 kDa zu finden waren. Bei 25 °C war eine Konzentrierung dieses Verteilungsmusters auf den Trennbereich zwischen 60 - 440 kDa festzustellen mit einem schwachen Signal bei ~20 kDa. Bei 45 °C verschwand dieses niedermolekulare Signal und eine weitere Konzentrierung des Verteilungsmusters im Trennbereich von ~120 - 240 kDa, mit einem nun sehr ausgeprägten Signal bei ~240 kDa war zu beobachten. Ein kleiner „niedermolekularer“ Rest bei 60 kDa war ebenfalls sichtbar. Unter *Recovery* Bedingungen zeigte sich das gleiche Trennmuster wie unter 25 °C Bedingungen. Im Gegensatz zu den Klasse 1 Proteinen (s.  $\text{His}_6\text{At17.8-CI}$  und  $\text{cutAt17.8-CI}$ ) zeigte das TEV-Protease geschnittene Klasse 2 sHSP  $\text{cutAt17.6-CII}$  leichte Veränderungen im Trennungsmuster im Vergleich zu seinem nicht geschnittenem Ausgangsprodukt ( $\text{His}_6\text{At17.6-CII}$ ). Einerseits waren kaum noch temperaturabhängige Änderungen im Trennmuster von  $\text{cutAt17.6-CII}$  zwischen 4 °C und 25 °C festzustellen (Abbildung 30). Andererseits war das relativ temperaturstabile Verteilungsmuster von  $\text{cutAt17.6-CII}$  bei 4 °C, 25 °C und *Recovery* Bedingungen dem Trennmuster von  $\text{His}_6\text{At17.6-CII}$  bei 25 °C und *Recovery* Bedingungen sehr ähnlich.  $\text{cutAt17.6-CII}$  zeigte bei 25 °C eine gleichmäßige Verteilung zwischen 17 und ~240 kDa. Nach Trennung bei 45 °C konzentrierte sich das Verteilungsmuster in dem Trennungsbereich zwischen 60 - 240 kDa, mit einhergehender Abnahme der niedermolekularen Signale zwischen 17 - 60 kDa. Von  $\text{At17.6-CII}$  konnten nur geringe Mengen geschnittenes Protein gewonnen werden, da das Entfernen des His6-Tags Aggregation auslöste. Daher konnten keine SEC

Separationen durchgeführt werden, da diese relativ große Mengen an Protein im Vergleich zu BN PAGE benötigten.

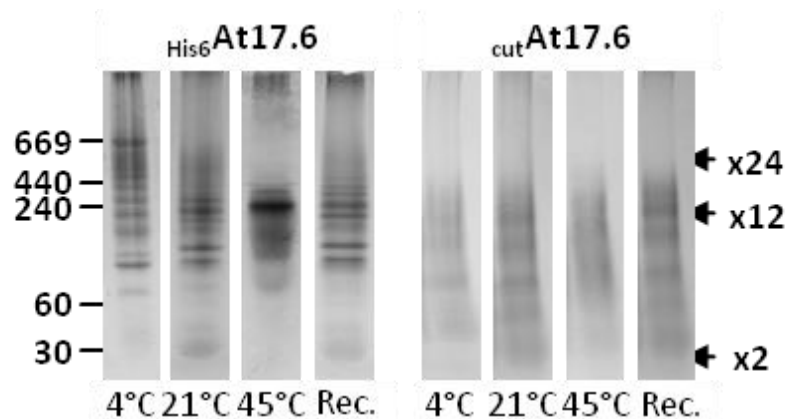


Abbildung 30: Quartäre Strukturanalyse von  $\text{His}_6\text{At17.6-CII}$  und  $\text{cutAt17.6-CII}$  bei verschiedenen Temperaturen

Das Entfernen eines Klasse 2 N-Terminus ( $\text{His}_6\text{At17.6}\Delta\text{N}_{1-41}$  und  $\text{cutAt17.6}\Delta\text{N}_{1-41}$ ) führte zu einer Reduktion der verschiedenen aufgetrennten Komplexe im Vergleich zu seiner *full-length* Version, doch auch hier waren Unterschiede zwischen TEV-Protease geschnittenem und nicht geschnittenem Protein feststellbar (Abbildung 31).

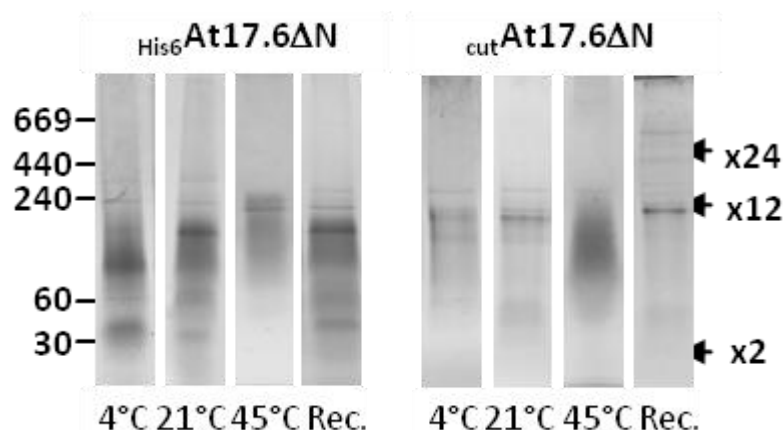


Abbildung 31: Quartäre Strukturanalyse von  $\text{His}_6\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$  und  $\text{cutAt17.6}\Delta\text{N-CII}$  bei verschiedenen Temperaturen

$\text{His}_6\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$  zeigte temperaturabhängige Komplexverteilung, auch zwischen 4 °C und 25 °C. Nach Entfernen des His6-Epitops war nur noch bei simulierten Hitzestress (45 °C) eine deutliche Veränderung im Trennmuster feststellbar.  $\text{His}_6\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$  zeigte bei 4 °C zwei ausgeprägte Komplexe bei ~30 und ~ 80 kDa, sowie zusätzliche Signale bei ~60, 180, 240 und 300 kDa. Bei 25 °C waren die niedermolekularen Signale (<80 kDa) schwächer, während die bei 4 °C schwächeren Signale bei ~180 kDa, bei 25 °C deutlich an Intensität zunahm. Es kam zu einer Verlagerung der Intensitäten innerhalb bereits bei 4 °C vorhandener Komplexe in Richtung der höher molekularen Komplexe bei 180 kDa. Bei 45 °C sammelten sich die getrennten Komplexe nur noch in einem Trennbereich zwischen 60 - 240 kDa mit



einem intensiven Signal bei ~200 kDa. Unter *Recovery* Bedingungen getrennte Proben zeigten das gleiche Trennmuster wie die bei 25 °C getrennten Proben. Das TEV-Protease geschnittene  $_{cut}At17.6\Delta N$ -CII separierte bei allen Temperaturen in wenigen Komplexen. Ein Hauptsignal ließ sich bei ~200 kDa beobachten mit schwächeren Signalen bei ~160 und 240 kDa. Das Trennmuster unterschied sich nicht bei 4 °C oder 25 °C, sowie *Recovery* Bedingungen. Bei 45 °C war eine diffuse Verteilung der getrennten Proteine in einem Trennbereich zwischen 80 - 240 kDa zu finden, mit einer Konzentrierung bei ~160 kDa. Aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich, dass das His6-Epitop einen Einfluss auf die Struktur der verschiedenen getesteten sHSPs hatte.

Weiterhin zeigten die dargestellten SEC Separationen weitestgehend Übereinstimmung mit den BN-PAGE Ergebnissen, doch der bei BN-PAGE in einigen Fällen dokumentierte einzelne dominante Komplex bei ~230 kDa war in den SEC Daten nicht immer dominant.  $_{His6}At17.6A$ -CI,  $_{His6}At17.6B$ -CI und  $_{His6}At18.1$ -CI zeigten deutliche Peaks im niedermolekularen Bereich ohne vergleichbar intensive Komplexe bei BN-PAGE Untersuchungen. Auch waren in einigen Fällen sehr große (8 - 9 ml) bei 280 nm absorbierende Bestandteile im SEC Elutionsprofil dokumentiert worden, welche nicht in den mittels SDS-PAGE getrennten Fraktionen beobachtet wurden (Abbildung 32). Die hier dargestellten bei 25 °C gewonnenen SEC-Profile wurden vor allem genutzt, die bei BN-PAGE getrennten sHSPs näher zu quantifizieren.

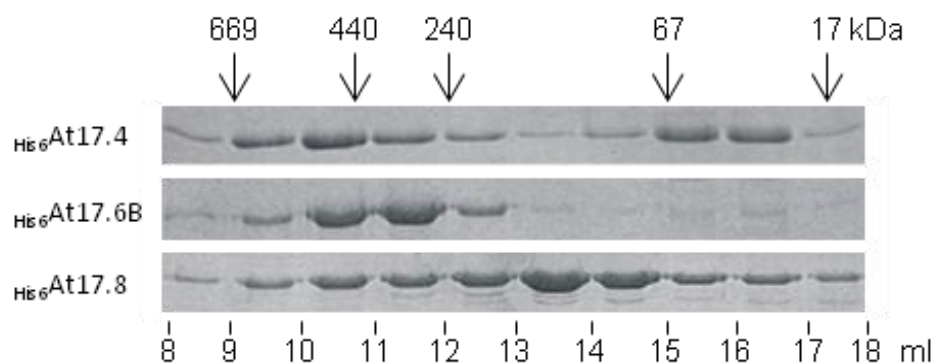


Abbildung 32: SDS-PAGE ausgewählter SEC Fraktionen

SEC Fraktionen wurden gesammelt, TCA gefällt und mittels SDS-PAGE getrennt.

Eine vergleichende Übersicht der erhaltenen Molekulargewichte wurde in Tabelle 11 zusammengestellt.

**Tabelle 11: Übersicht der beobachteten quartären Strukturen der untersuchten Proteine**

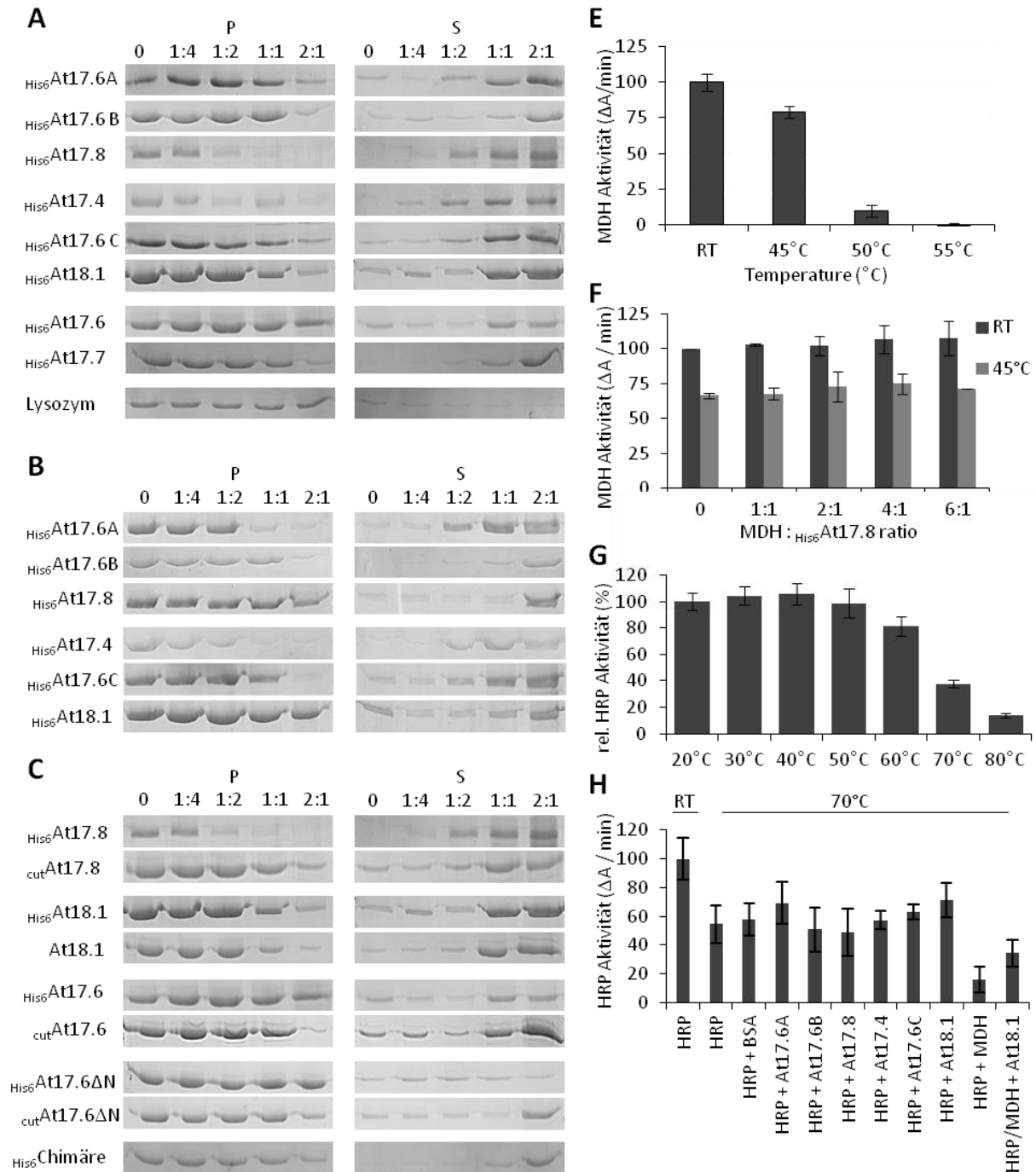
Protein	Oligomergewichte BN-PAGE bei 25 °C in [kDa]	Oligomergewichte SEC bei 25 °C in [kDa]	Anzahl Monomere
His6 <b>At17.4</b>	430, (120), (40)	458, 39, 22	23, 2, 1
His6 <b>At17.6C</b>	200, (120), (60), 40	237, 86, 35	12, 4, 2
His6 <b>At17.8</b>	(340), 40	356, 71, 35	18, 4, 2
cut <b>At17.8</b>	(340), 40	356, 35	18, 2
His6 <b>At18.1</b>	200, (180), (80), 40	237, 86, 35	12, 4, 2
<b>At18.1</b>	550, 200, 40	250, 151	14, 8
His6 <b>At17.6A</b>	200, (120), (60), 40	237, 86, 35	12, 4, 2
His6 <b>At17.6B</b>	340, 230, 80, 60, 40	338, 38, 21	16, 2, 1
His6 <b>At17.6</b>	240, 200, 160, 80, 40	237, 91, 33	12, 4, 2
cut <b>At17.6</b>	200, 160, 80, 40	---	---
His6 <b>At17.7</b>	200, (80), 40	250, 91, 33	12, 4, 1
His6 <b>At17.8ΔN</b>	200, 40	204, 86, 33	12, 4, 2
His6 <b>At17.6ΔN</b>	240, 200, 160, 80, 40	194, 71, 28	12, 4, 2
cut <b>At17.6ΔN</b>	240, 200, 160, 80	---	---
His6 <b>Chimäre</b>	200, 40	237, 78, 33	12, 4, 2
<b>MDH</b>	---	86, 39	2, 1
His6 <b>CPH1Δ2</b>	---	136, 64	2, 1

### 3.4 Funktionsanalyse

In diesem Abschnitt wurden funktionelle Charakteristika der isolierten sHSPs untersucht. Es sollte untersucht werden, wie sHSPs ausgewählte Klienten-Proteine vor thermisch induzierter Denaturierung bewahren können.

### 3.4.1 MDH als Klient

Die gereinigten sHSPs wurden einer etablierten Funktionsanalyse unterzogen (Lee et al., 1997; Basha et al., 2006). Es wurde untersucht, welche der gereinigten sHSPs die Möglichkeit besitzen, andere thermolabile Proteine unter denaturierenden Bedingungen vor irreversibler Aggregation und daraus resultierender Präzipitation zu schützen. Es wurden je 3  $\mu$ M MDH als thermolabiles Protein entweder alleine oder mit definiert steigenden molaren Mengen eines sHSPs bei 45 °C für 1 h inkubiert. Nach abtrennen der präzipitierten Proteinfraction wurden die Fraktionen mit löslichen (Soluble) und aggregierten (Pellet) Protein vergleichend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 33). Es zeigte sich, dass alle gereinigten sHSP *full-length* Proteine mit und ohne His6-Epitop in der Lage waren MDH vor Aggregation bei 45 °C zu schützen (Abbildung 33A). Steigende sHSP Ratio resultierten in intensiveren MDH Signalen in der löslichen Fraktion mit gleichzeitiger Abnahme der komplementären MDH Signale in der zentrifugierten aggregierten Fraktion. MDH ohne sHSPs aggregierte unter den gewählten Bedingungen komplett. In vorherigen Experimenten wurde gezeigt (s. Löslichkeitsexperimente, CD-Spektroskopie), dass sHSPs löslich bis zu der höchsten getesteten Temperatur (80 °C) waren. In Kombination mit der hier durchgeführten Klient-Protektionsanalyse sollte getestet werden, ob sHSPs auch nach einer thermischen Vorbehandlung bei 80 °C Chaperonaktivität zeigten. Alle *full-length* His6sHSPs der Klasse 1 wurden für 1 h 80 °C ausgesetzt, bevor sofort im Anschluss eine Klient-Protektionsstudie nach oben beschriebenem Schema durchgeführt wurde (Abbildung 33B). Auch hier ließ sich feststellen, dass sHSP Zugabe zur Abnahme von MDH in der Pellet Fraktion führte, wenn auch in leicht vermindertem Maße. Die einzigen getesteten Proteine welche zu keiner sichtbaren Klient-Protektion führten waren das als negative Kontrolle ausgewählte Lysozym, sowie die His6-Epitop tragenden Klasse 1 und 2 Protein-Deletionen His6At17.8 $\Delta$ N-CI (nicht gezeigt) und His6At17.6 $\Delta$ N-CII (Abbildung 33C). Entfernen des His6-Epitopes (<sub>cut</sub>At17.6 $\Delta$ N-CII) oder die Insertion eines Klasse 2 N-Terminus zwischen His6-Epitop und Klasse 1 Rückgrat (Chimera) führte zu einer Zunahme von löslichem Klient. Es wurde nun getestet welche Unterschiede in den MDH Enzymaktivitäten feststellbar waren, wenn MDH alleine oder zusammen mit sHSPs thermischer Belastung ausgesetzt war.



**Abbildung 33: Klient-Protektionsanalyse mit MDH als Klient**

Steigende Molare Mengen an His6-sHSPs (A) wurden in vergleichender Weise zu ihren nativen und anderweitig modifizierten Versionen (C) mit je 3  $\mu$ M MDH bei 45 °C für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurden je ein Aliquot des unlöslichen Pellets (P) und ein Aliquot des löslichen Überstandes (S) mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Überprüfung der Funktionalität von hitzevorbehandelten sHSPs (B), wurden vor dem bereits beschriebenen Prozedere die getesteten sHSPs bei 80 °C für 1 h vorbehandelt. (F-H) Klient Aktivitätsprotektionsanalyse von MDH und HRP mit und ohne sHSPs. Nach Dokumentation des Aktivitätsverlustes von MDH (E) und HRP (G) bei verschiedenen Temperaturbedingungen wurde in einem ersten Ansatz die Restaktivität von MDH ohne und mit steigender His6-At17.8 Ratio nach 1 h Inkubation bei 45 °C (F) bestimmt. (G) HRP wurde alleine oder mit angezeigten Proteinkombinationen für 1 h bei 70 °C inkubiert. Es wurde immer eine 1:1 Ratio in Bezug auf HRP verwendet. Die Fehlerbalken präsentieren den Standardfehler der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die bei 25 °C gemessene Grundenzymaktivität ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ ) von 15  $\mu$ M MDH wurde bestimmt und 100 % gesetzt (Abbildung 33E). Die weiteren unter verschiedenen

Bedingungen gemessenen Enzymaktivitäten wurden dazu prozentual in Relation gesetzt. MDH bei 45 °C für 1 h alleine inkubiert, führte zu einer Abnahme der gemessenen Restaktivität auf ~75 - 80 %. Ein Vergleich mit um 5 °C erhöhter Temperatur (50 °C) zeigte eine weitere Verringerung auf 15 % Restaktivität. Die Zugabe von steigenden Mengen an sHSPs (<sub>His6</sub>At17.8-Cl; Abbildung 33F) führte zu keiner Veränderung der bei 25 °C und bei 45 °C gemessenen Aktivitäten. Das als Kontrolle verwendete Protein (Lysozym) zeigte ebenfalls keinen Schutzeffekt (nicht gezeigt).

Wie für MDH beschrieben, wurde in einem kombinierten Ansatz HRP (Horse-Radish-Peroxidase) als exemplarisches thermostabiles Protein einer Denaturierungsreihe mit nachfolgender Restaktivitätsbestimmung unterzogen (Abbildung 33G). Ab einer Temperatur von 70 °C war eine Reduktion der HRP Restaktivität auf ~50 % im Vergleich zu der bei 25 °C gemessenen Grundaktivität (100 %) feststellbar. Wurden zu HRP vor der Hitzebehandlung diverse <sub>His6</sub>sHSPs in äquimolaren Mengen zugegeben (Abbildung 33H), lag die resultierende Restaktivität zwischen 45 – 70 %. Zugabe von thermolabiler MDH vor der Hitzebehandlung führte zu einer Reduzierung der HRP Restaktivität auf ~17 %. Addition eines sHSPs (<sub>His6</sub>At18.1) zu MDH und HRP komplementierte diesen Effekt zu einem gewissen Ausmaß, erkennbar an einer leicht erhöhten HRP Restaktivität (30 - 40 %).

### 3.4.2 CPH1Δ2 als Klient

CPH1Δ2 wurde als neues, weiteres Klientenprotein in die Funktionsanalysen mit einbezogen. Fotoreversibles CPH1Δ2 besteht aus zwei Komponenten, dem Apoprotein und dem Chromophor, in diesem Fall Phycocyanobilin. Zuerst wurde die Abnahme der rot / dunkelrot Licht induzierten Fotokonversion ohne sHSP Zugabe bei verschiedenen Temperaturen getestet und dokumentiert (Abbildung 34A & B). Zur besseren Darstellung des fotokonvertierbaren Proteinanteils wurde ein Differenzspektrum (rot - dunkelrot) kalkuliert (s. für Details Abbildung 5). Eine Fotokonversionsabnahme startete bei 50 °C, Aggregationen zwischen 50 - 60 °C. Bei 50 °C fotokonvertierten nur noch die Hälfte der eingesetzten CPH1Δ2 Moleküle. Zur Absicherung der gezeigten ZnAc Färbungen, wurde die ZnAc Auflösungsgrenze,

sowie Selektivität vergleichend zu dem in dieser Arbeit verwendetet Coomassie *Brilliant Blue* R-250 Farbstoff getestet.

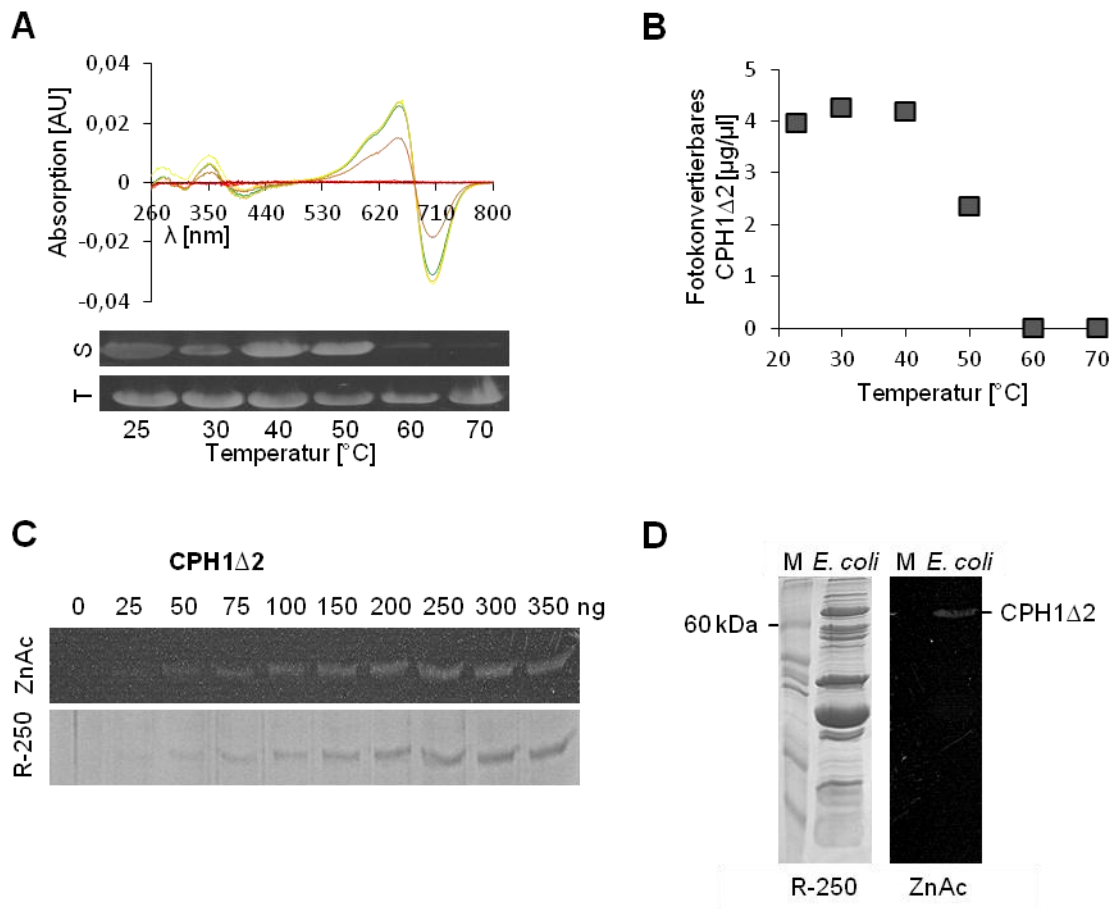
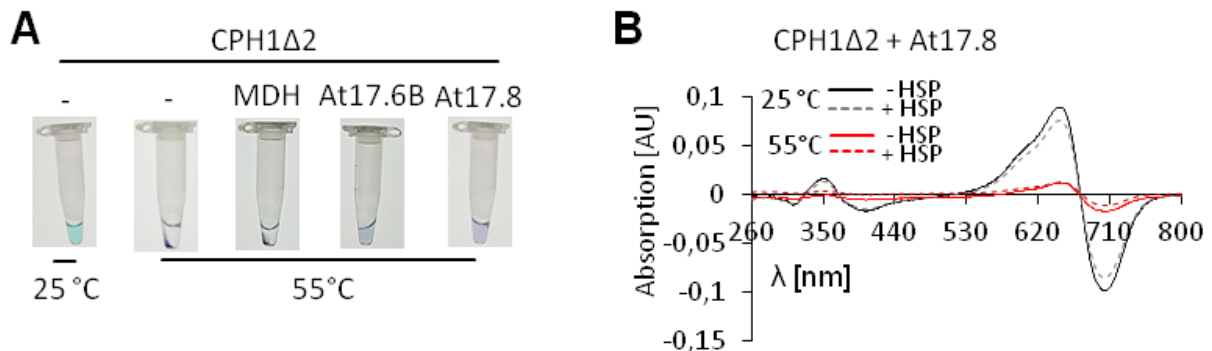


Abbildung 34: Voranalysen mit CPH1Δ2

(A) Die berechneten Differenzspektren (Pr-Pfr) zeigten die restliche Fotokonvertierbarkeit nach jeweiliger Vorbehandlung für 1 h an (schwarz = 25 °C; hell gelb = 30 °C, hell orange = 40 °C, orange = 50 °C, rot = 60 °C, dunkel rot = 70 °C). Ein Aliquot wurde vor (T) und nach Inkubation (S) bei angegebener Temperatur entnommen und nach Zentrifugation mittels SDS-PAGE analysiert. (B) Mit Hilfe der Differenzspektren errechnete Konzentrationen der fotoreversiblen Moleküle nach angegebener Temperaturbehandlung. (C) Test der Auflösungsgrenze der verwendeten ZnAc Färbung im Vergleich zu Coomassie *Brilliant Blue* R-250. (D) Selektivität der ZnAc Färbung im Vergleich zu R-250. Verwendet wurde ein Lysat aus CPH1Δ2 exprimierenden *E. coli* Zellen.

Vergleichend durchgeführte ZnAc Färbungen zeigten, dass diese eine mit Coomassie R-250 (R-250) vergleichende Auflösungsgrenze (~ 50 ng Protein) hatten und nur korrekt assembliertes CPH1Δ2 in einem *E. coli* Lysat (CPH1Δ2 Expression geerntet nach 18 h) färbten (Abbildung 34C & D). Das fertig assemblierte Holoprotein zeigte bei Tageslichtbedingungen eine türkise Farbe (Abbildung 35A). In einer vergleichenden Analyse wurde CPH1Δ2 entweder alleine, mit ausgewählten sHSPs (<sub>His6</sub>At17.6B, <sub>His6</sub>At17.8) oder MDH für 1 h bei 55 °C inkubiert. Im Anschluss wurde für 5 min mit 21.000g zentrifugiert. CPH1Δ2 alleine oder mit MDH aggregierte nach Hitzebehandlung und war im Pellet zu finden, wodurch der Überstand klar und

farblos war. Addition der sHSPs führte nach Hitzebehandlung zu einer klaren, blauen Lösung mit keinem sichtbaren Pellet.



**Abbildung 35: Klient-Protektionsanalyse mit CPH1Δ2 als Klient**

(A) Cph1Δ2 wurde alleine oder mit angezeigten sHSPs oder MDH für 1 h bei 55 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben dokumentiert. Der Ansatz At17.8 und CPH1Δ2 wurde vor und nach Hitzebehandlung auf Fotokonversion getestet und mit einem Aliquot CPH1Δ2 ohne sHSPs (B) verglichen.

Der im löslichen Überstand enthaltene CPH1Δ2 Anteil wurde auf Fotokonversion getestet (Abbildung 35B). Hitze führte zu einer Abnahme der beobachtbaren Differenz zwischen Pr und Pfr Konformation. Addition eines sHSPs (At17.8-Cl) resultierte nach Temperaturbehandlung in keiner höheren Fotokonversion.

### 3.4.3 Analyse der sHSP / Klienten Interaktionen

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie sollte das sHSP / Klienten Verhalten nach verschiedenen Temperaturvorbehandlungen untersucht werden. Die SEC Analysen fanden bei 25 °C statt. Wurde MDH alleine mit erhöhten Temperaturen (45 °C) vorbehandelt, kam es zu keiner Verlagerung der beobachteten Peaks im gemessenen Separationsprofil (Abbildung 36A). Einhergehend mit einer gleichmäßigen Abnahme des bei der SEC Separation beobachteten MDH Peaks war eine leichte Abnahme an MDH in den SDS-PAGE getrennten Eluatfraktionen zu beobachten (Abbildung 36B). Wurden sHSPs und MDH bei 25 °C zusammen inkubiert blieb das Separationsprofil von MDH unbeeinflusst. Wurde eine sHSP / MDH Proteinmischung vor der Trennung einer für MDH denaturierenden Bedingung ausgesetzt (45 °C für 1 h), zeigten die dokumentierten Elutionsprofile deutliche Veränderungen. Ein neuer Peak bei 8 - 9 ml erschien, während der beobachtete Peak im Bereich von 15 - 16 ml abflachte.

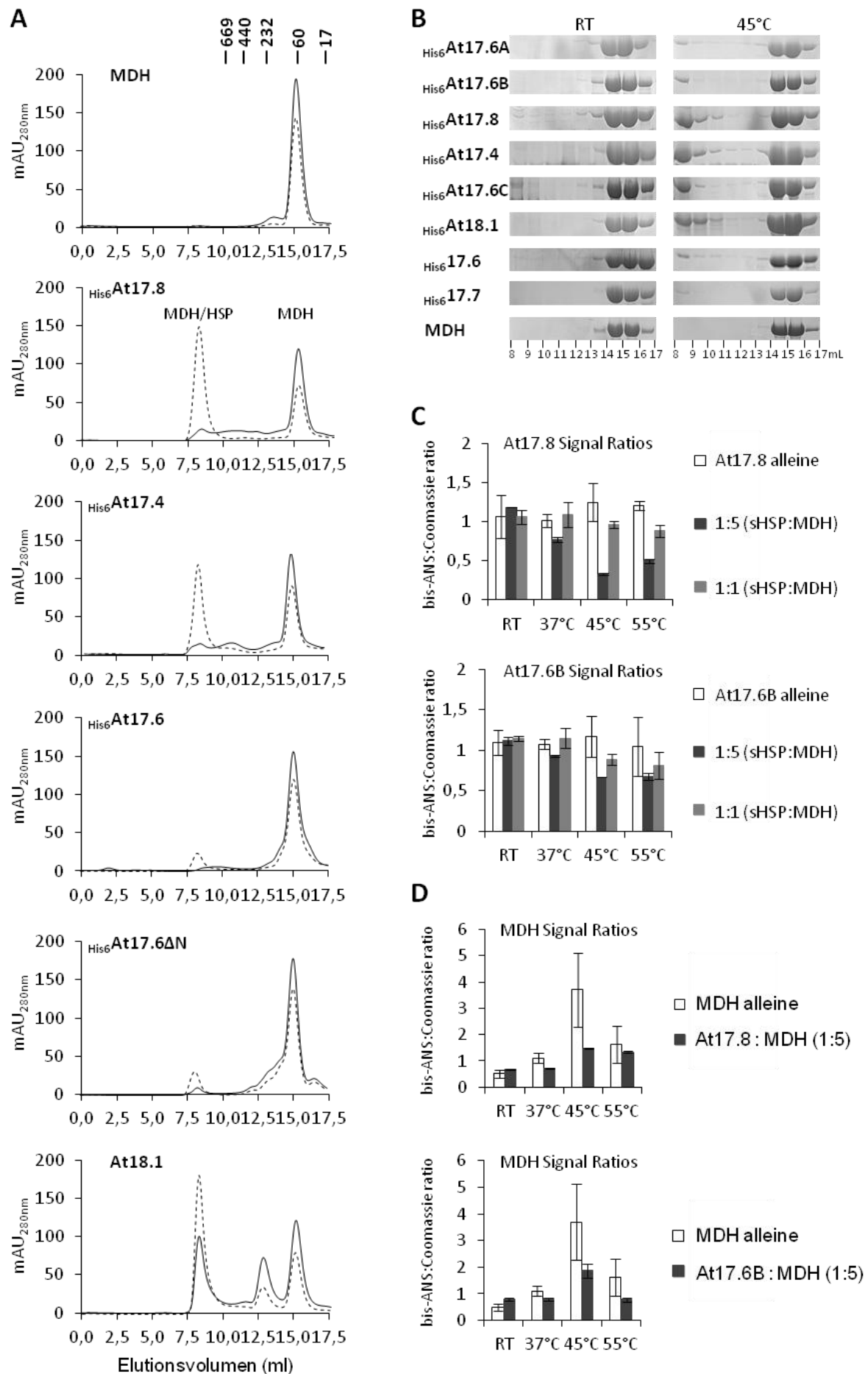


Abbildung 36: sHSP / MDH Komplexbildung unter denaturierenden Temperaturen

MDH wurde alleine oder in Kombination mit einer äquimolaren Ratio (Klasse I) oder im 10 fachen Molaren Überschuss zu sHSPs der Klasse II für 1 h bei 45 °C inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SEC



getrennt und bei 280nm dokumentiert (A). 1 mL Eluatfraktionen wurden gesammelt und nach Aufkonzentrierung mittels SDS-PAGE analysiert (B). (C & D) bis-ANS Kompetitionsassay wurde durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Dargestellt wurden die berechneten bis-ANS Fluoreszenz- zu Coomassie-Intensitäten Ratios von sHSP / MDH Ko-Inkubationen bei angegebener Temperatur. In (C) wurden die errechneten Ratios der sHSP Signale angezeigt und in (D) die Ratios der dazu korrespondierenden ko-inkubierten MDH Signale. Die Fehlerbalken präsentieren den Standardfehler der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Analyse der betreffenden Eluate zeigte, dass bei 8 - 9 ml sHSP und MDH in der gleichen Fraktion eluierten, während bei 15 - 16 ml restliches ungebundenes, nicht denaturiertes MDH eluierte (zur besseren Übersicht wurde hier nur das MDH Signal gezeigt). Nur eine Inkubation ab 45 °C führte zu der beschriebenen beobachtbaren Zunahme von sHSP und MDH in der früh eluierenden Fraktion bei 8 - 9 ml. Alle getesteten sHSPs, sowie auch die exemplarische Klasse 2 Deletion reagierten mit dem gleichen beobachtbaren Mechanismus, wenn auch mit unterschiedlichen Effektivitäten. Die beobachteten Effektivitäten schwankten auch innerhalb der Klasse 1 Proteine, so dass einige sHSPs protektiver wirkten (At17.8, At17.4, At17.6C und At18.1), als andere.

Wie bereits im bis-ANS Bindungsassay beschrieben, zeigten <sub>His6</sub>HSPs in der Tendenz ein bei allen Temperaturen eher konstant hohes bis-ANS Bindungsvermögen, während MDH ein mit Temperatur ansteigendes Bindungsverhalten zeigte. Ein parallel durchgeführter bis-ANS Kompetitionsassay (Abbildung 36C & D) zeigte eine Abnahme der kalkulierten Fluoreszenz zu Coomassie Ratios, nach Zugabe von sHSPs zu einem Überschusses an MDH (1:5). Die gemessene Fluoreszenzintensität zu Coomassie Signalstärken Ratio verringerte sich bei 37 °C und war bei 45 °C minimal, sowohl bei den gemessenen sHSP-, als auch bei den MDH - Signalen. Bei 55 °C wurden die Ratios wieder leicht stärker. Wurden mehr sHSPs mit MDH inkubiert (1:1) verringerte sich der beobachtete Effekt. sHSPs scheinen an derselben Oberflächenstruktur für Klienten- und bis-ANS-Bindung zugänglich zu sein, so dass ein kompetitives Verhalten zu beobachten war. Das in vergleichender Weise zu MDH getestete CPH1Δ2 zeigte, dass <sub>His6</sub>At17.8-CI und CPH1Δ2 weder bei 25 °C noch bei 45 °C reagierten (Abbildung 37A & B). Ab 50 °C war der Anstieg eines Peaks in der früh eluierenden Fraktion (8 - 9 ml) zu beobachten. Bei 55 °C war eine weitere Zunahme zu beobachten. Aufgrund der Absorptionseigenschaften von CPH1Δ2 wurden diese Analysen nicht nur bei einer Absorptionswellenlänge (280 nm) dokumentiert, sondern auch bei 660 nm, sowie 700 nm.

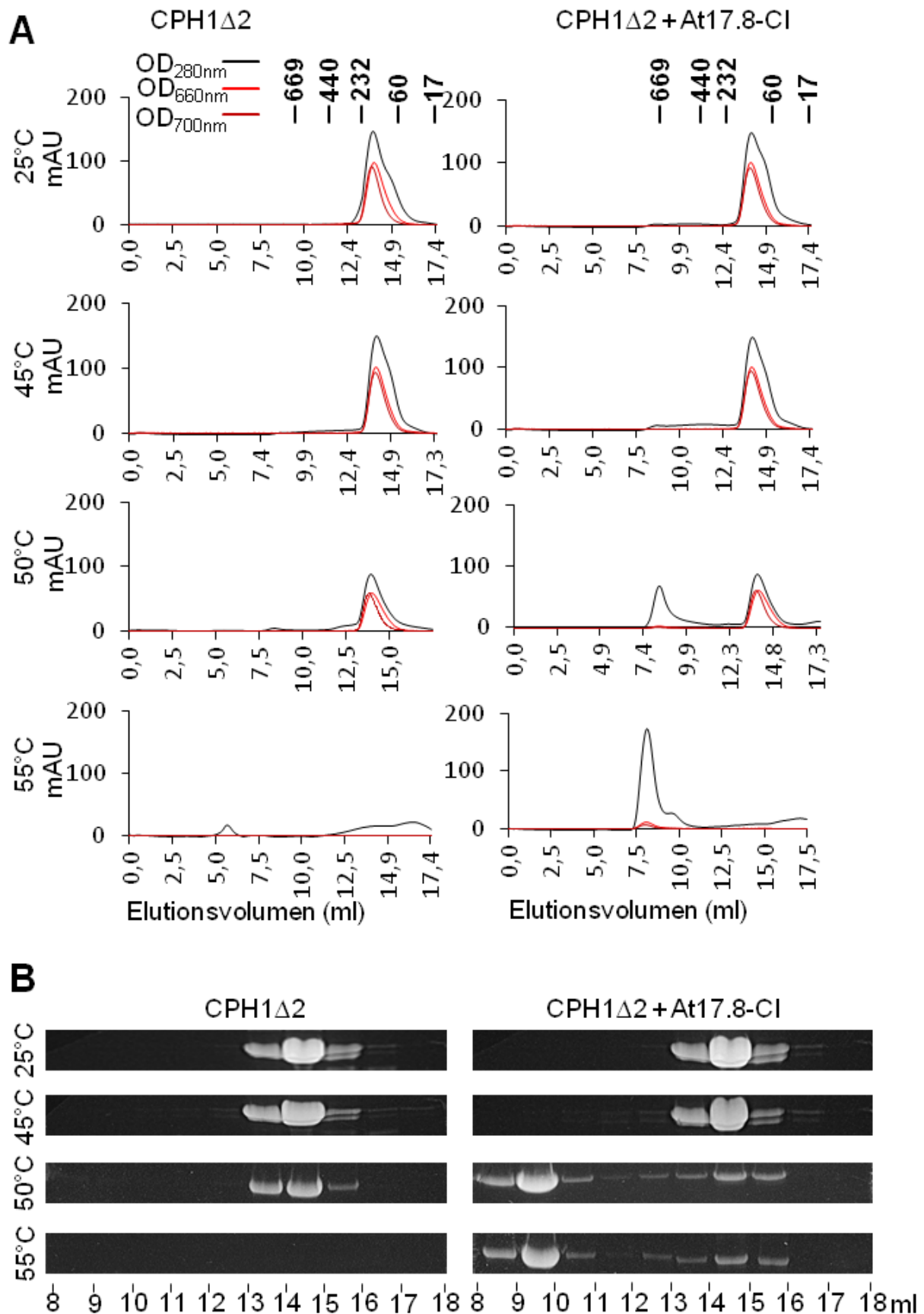


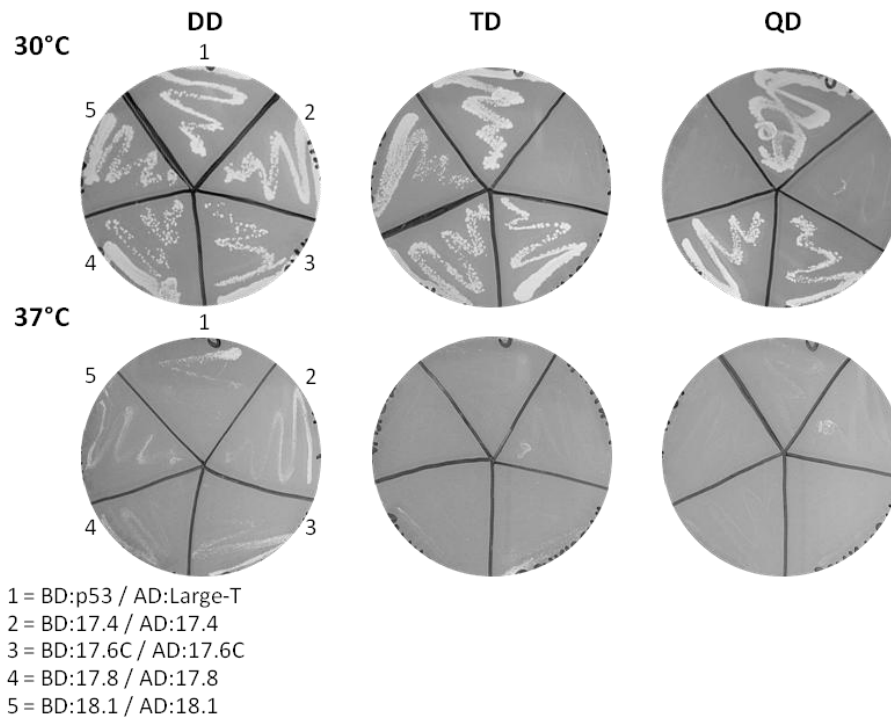
Abbildung 37: sHSP / CPH1 $\Delta$ 2 Komplexbildung unter denaturierenden Temperaturen

(A) CPH1 $\Delta$ 2 wurde alleine (linke Spalte) oder im 10fachen Überschuss zu At17.8 (rechte Spalte) bei 25, 45, 50 und 55 °C für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mittels SEC separiert. Der Lauf wurde bei den angegebenen Wellenlängen beobachtet. Gesammelte 1 mL Fraktionen wurden konzentriert und mittels SDS-PAGE getrennt (B), ZnAc gefärbt und dokumentiert.

So ließ sich direkt mit der jeweiligen Wellenlänge beobachten, welcher Teil der allgemeinen Proteinabsorption ( $A_{280\text{nm}}$ ) in den gezeigten Elutionsprofilen vom Klienten resultierte (660 nm und 700 nm). Der separat beobachtbare Anteil (660 nm und 700 nm) zeigte unter denaturierenden Bedingungen nur einen minimalen Zuwachs in der früher eluierenden Phase. Neben der bei 280 nm gemessenen Absorption, zeigte auch die Fraktionsanalyse, dass  $\text{His}_6\text{At17.8-CI}$  und  $\text{CPH1}\Delta 2$  in der gleichen Fraktion zwischen 8 - 9 ml vorhanden waren (zur besseren Übersicht wurde nur der  $\text{CPH1}\Delta 2$  Anteil gezeigt).  $\text{His}_6\text{At17.8-CI}$  hatte  $\text{CPH1}\Delta 2$  unter denaturierenden Bedingungen gebunden und löslich gehalten, doch die Rot und dunkel rot Licht absorbierenden Eigenschaften des Phytochroms waren stark beeinträchtigt. Das parallel dazu getestete  $\text{His}_6\text{At17.6B-CI}$  zeigte einen vergleichbaren temperaturinduzierten Klienten Einlagerungsmechanismus, wenn auch mit geringerer Effizienz. Für einen sichtbaren Effekt wurde eine 1:1 Ratio benötigt (Eisenhardt, 2012).  $\text{His}_6\text{At17.8-CI}$  zeigte für beide getestete Klienten ( $\text{MDH}$  und  $\text{CPH1}\Delta 2$ ) hohe Bindungseffizienz unter denaturierenden Temperaturen, während  $\text{His}_6\text{At17.6B-CI}$  in beiden Fällen niedrigere Effizienz zeigte.

#### **3.4.4 Exemplarische *in vivo* Funktionsstudie**

Eine abschließende an die Ergebnisse der vorherigen Interaktions- und Funktionsanalysen angelehnte Untersuchung testete, inwiefern Hefen erhöhte Temperaturen tolerieren können, wenn diese sHSPs exprimierten. Es wurden verschiedene sHSP Homodimerisierungskombinationen im Vergleich zur Hefe 2-Hybridsystem positiv-Kontrolle (p53 / large-T) aufgetragen und bei „normalen“ (30 °C) oder erhöhten Temperaturen (37 °C) für 3 Tage inkubiert. Wie in Abbildung 38 zu entnehmen, wuchsen bei 37 °C alle getesteten Kombinationen gerade noch auf DD Medium, aber nicht auf TD und QD Medium. Eine durch sHSPs vermittelte höhere Thermotoleranz war mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems nicht zu beobachten gewesen.



**Abbildung 38: Hefewachstumsanalyse bei schwerem Hitzestress**

Die angezeigten AD und BD Kombinationen wurden auf verschiedenen stringenteren Mangelmedien ausgestrichen und bei 30 °C oder 37 °C für 3 Tagen inkubiert.

## 4 Diskussion

sHSPs der zytosolischen Klassen 1 und 2 aus *Arabidopsis* wurden in dieser Arbeit vergleichend analysiert. Zuerst wurden cDNAs aus nicht gestressten und gestressten *A. thaliana* Pflanzen hergestellt, aus welchen cDNAs der verschiedenen untersuchten Hitzestressproteine isoliert werden konnten. Trotz der teilweise sehr starken Ähnlichkeiten der einzelnen sHSP Sequenzen, konnten die Sequenzen einzelner sHSPs aus der aus hitzestressenden Pflanzen erstellten cDNA, überraschenderweise in vielen Fällen auch aus der Kontrolle (Pflanzen vor der Ernte bei 20 - 25 °C gehalten), spezifisch angereichert werden. Einige Transkriptionsprofilanalysen zeigten vor allem hitzestress-, aber in manchen Fällen auch ein breites Spektrum anderweitiger stressassoziiierter Transkriptionsteigerungen der untersuchten sHSP Gene (Swindell et al., 2007; Siddique et al., 2008). Einige der untersuchten Mitglieder waren aber auch zu bestimmten entwicklungspezifischen Stadien hochreguliert (Kotak et al., 2007; Dafny-Yelin et al., 2008). Eine weitere, diesen Arbeiten vergleichbare, semi-quantitative PCR Analyse, in Kombination mit *pull-down* Analysen aus Pflanzenextrakten, konnte ebenfalls sHSP Transkriptions- und Translationsprodukt auch bei nicht hitzestressenden Pflanzen nachweisen (Kim

et al., 2011). Auch wurde bereits eine durch bestimmte Metalle, Aminosäure Analogons oder oxydativen Stress induzierte sHSP Expression beobachtet (Lee et al., 1996; Banzet et al., 1998; Guan et al., 2004). Die hier verwendeten und verschieden vorbehandelten Pflanzen zeigten keine äußerlichen Unterschiede, sahen gesund aus und waren ihrem Alter entsprechend entwickelt, daher wurden anderweitige stressinduzierende Faktoren durch abiotische oder biotische Stressoren ausgeschlossen. Eine durch die Ernte induzierte sHSP Expression, als Antwort auf die Verwundung (Swindell et al., 2007), wurde durch sofortiges einfrieren in flüssigen Stickstoff vermieden.

Da in dem hier untersuchten Fall der komplette Pflanzenkörper zur RNA Extraktion für die cDNA Synthese eingesetzt wurde, konnte nicht bestimmt werden ob die erhaltenen sHSP Transkripte einem bestimmten Organ oder Gewebeabschnitt entstammten. Eine dem Entwicklungsstand abhängige Transkription einiger sHSPs, welche noch nicht dokumentiert wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden. Vor allem für At17.8-CI liegen außer den hier präsentierten und den von Kim et al. (2011) beschriebenen semi-quantitativen Analysen keine anderweitigen hitze spezifischen Transkriptionsanalysen vor. Auf den für Arabidopsis häufig für Microarray Analysen standardisiert verwendeten Affymetrix ATH1 Gene Chip war keine At17.8-CI Sequenz vorhanden, so dass im Vergleich zu anderen sHSPs die Datenlage sehr lückenhaft ist (Siddique et al., 2008). Entwicklungsbiologische Studien an Trichomen zeigten aber, dass At17.8 zusätzlich zu Hitze, auch mit bestimmten Entwicklungsstadien assoziiert vorgefunden werden kann. In Arabidopsis gehörte es zu den 5 % der am stärksten hochregulierten Transkripte in Trichomen (Jakoby et al., 2008).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die untersuchten sHSPs scheinbar unabhängig von Hitzestress zu häufigeren Zeitpunkten in Arabidopsis vorliegen als die Nomenklatura vermuten ließe. sHSPs der Klasse 2, vor allem At17.6 schien dabei strikt Hitze reguliert, im Vergleich zu den anderen getesteten Mitglieder der Klasse 1. Bereits früher wurde beschrieben, dass in *P. sativum* Ps17.7-CII erst bei leicht höheren Temperaturen im Vergleich zum getesteten Ps18.1-CI vorlag. Auch waren das Klasse 2 sHSP unter *Recovery* Bedingungen schneller wieder verschwunden (Helm et al., 1997). Generell waren die bisherigen veröffentlichten Daten noch zu lückenhaft, so dass nicht gesichert war, ob die striktere Transkriptionskontrolle der Klasse 2 sHSPs ein für diese Klasse spezifische Eigenschaft darstellte.

Die weiteren Analysen zeigten in wenigen Aspekten ein von sHSP Klassenzugehörigkeit unabhängiges übereinstimmendes Verhalten, aber in den meisten anderen Analysepunkten sehr divers zu diskutierende Resultate. Die erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf Interaktions-, Struktur- und Funktionsanalysen wurden in den nachfolgenden jeweiligen Abschnitten diskutiert, bevor erarbeitete allgemeine Unterschiede und Gemeinsamkeiten innerhalb einer und zwischen den sHSP Klassen abschließend zusammenfassend diskutiert wurden.

#### 4.1 Interaktionsanalyse

Die für eine Interaktionsanalyse ausgewählten Proteine wurden einer *in vivo* Lokalisationsstudie unterzogen. Nach Komplettierung dieser Studie war zu bemerken, dass eine gleichmäßige Verteilung im Zytosol bei allen Klasse 1 sHSPs zu beobachten war. Während At17.7-CII sich wie Klasse 1 sHSPs verhielt, war At17.6-CII als stark konzentrierte Fluoreszenzpunkte im Zytosol zu sehen. Die beobachtete Fluoreszenzverteilung wurde weder durch die Expressionsdauer der transfizierten Konstrukte noch durch einen applizierten Hitzestress beeinflusst. Das Klasse 2 Deletionskonstrukt zeigte, dass für Granula Bildung eine ACD und C-Terminus ausreichend waren. Einhergehend mit früheren Publikationen zeigte die exemplarische Analyse der Chimäre, dass in die Granulabildung der klassenspezifische Klasse 2 N-Terminus nicht involviert war (Kirschner et al., 2000). Zur Übersicht wurden ausgewählte Aminosäuresequenzen verschiedener sHSPs verglichen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede einzelner sHSPs verschiedener Klassen hervorzuheben (Abbildung 39). Innerhalb der C-terminalen Extension von At17.7 waren vor allem zwei Aminosäuren interessant. Einmal das mit dem Pfeil markierte unpolar / hydrophobe Isoleuzin, welches bei allen anderen sHSPs die sehr ähnliche unpolare / hydrophobe Aminosäure Valin war. Weiterhin das direkt daneben befindliche unpolar / hydrophobe Prolin hatte At17.7 mit allen anderen untersuchten Klasse 1 sHSPs aus *A. thaliana* und *P. sativum* gemein. Die anderen Granula bildenden sHSPs der Klasse 2 hatten an dieser Position ein polares / neutrales Asparagin oder Glutamin. Dies könnte daher von Bedeutung sein, da Prolin bekannt ist für seinen starken Einfluss den es auf Proteinfaltung und Proteinstrukturen haben

kann (Levitt, 1981; Hurle, 1987). Neben den hier erhaltenen indirekten Hinweisen müsste durch zielgerichtete Deletion und / oder Aminosäureaustausch noch direkt bewiesen werden, dass genau diese Aminosäure für fehlende Granula Bildung von At17.7 verantwortlich war.

**Abbildung 39: Aneinanderreihung von ausgewählten Klasse 1 und Klasse 2 sHSP Aminosäuresequenzen der C-terminalen Extension**

Ein weiterer Unterschied zwischen den hier erhaltenen Ergebnissen und anderen Analysen wurde während den Lokalisierungsstudien bei Doppeltransfektionen mit zwei sHSPs aus unterschiedlichen Klassen gefunden. Bereits für Ps17.7-CII beschriebene von Hitzestress abhängige Bildung von Granula, sowie das *Recruitment* von anderen sHSPs der Klasse 1 in vorhandene Granula (Kirschner et al., 2000), konnte für unsere getesteten sHSPs aus *A. thailana* nicht dokumentiert werden. In den von anderen Gruppen beschriebenen Experimenten wurden die Tabakprotoplasten fixiert und die transient exprimierten sHSPs mittels fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgewiesen (Kirschner et al., 2000). In dieser Arbeit genutzte Fusionsproteine aus Fluoreszenzprotein und zu untersuchendem sHSP vermieden zwar eine möglicherweise mit Stress verbundene Antikörper-Fixierung (18 h Fixierung), doch wurden durch die Fusion mit dem Fluoreszenprotein (~400 - 450 AS) den sHSPs (~165 AS) sehr lange Abschnitte hinzugefügt. Die vergleichend analysierten YFP- bzw. CFP-Ps17.7-CII Fusionen zeigten ebenfalls Granulastrukturen im Zytosol (Daten nicht gezeigt). Diese waren wie die beschriebenen At17.6-CII Granula konstitutiv vorhanden und Hitze änderte ihre Verteilung nicht. Da die Fusion N-Terminal angefügt wurde und wie bereits beschrieben der C-Terminus verantwortlich für die Granula Strukturen scheint, wurde

ein Einfluss der N-terminalen Fusion auf die allgemeine Fähigkeit zur Granulabildung als gering erachtet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Fusion den beschriebenen Rekrutierungsmechanismus von Klasse 1 Protein in Klasse 2 HSG störte. Doch bisherige Analysen zeigten, dass der C-Terminus von Klasse 2 Proteinen für diese Rekrutierung benötigt wird, so dass auch hier keine Interferenzen durch N-terminale Modifikationen zu erwarten wären (Kirschner et al., 2000; Siddique et al., 2003).

Die bisher veröffentlichten Experimente nutzten Protoplasten zur *in vivo* Lokalisationsanalyse welche aus dem Mesophyll von Tabak- oder Tomaten-Blättern gewonnen wurden (Kirschner et al., 2000; Tripp et al., 2009). Granulabildung von Klasse 1 Protein wurde auch ausgelöst, wenn die zelluläre Proteinbiosynthese nicht durch Cycloheximid inhibiert wurde (Helm et al., 1997; Kirschner et al., 2000). Es war nicht auszuschließen, dass das als Speicher angelegte und fotosynthetisch inaktive (dormante) Zwiebelknollengewebe zu den Unterschieden in der beobachteten Hitzestressantwort beitrug. Es wurden bereits massive Akkumulierung von sHSPs in Zwiebelknollen (und diversen anderen Speichergeweben) beschrieben, so dass Interferenzen mit endogenen Zwiebel sHSPs nicht ausgeschlossen werden konnte und daher At17.6-CII und Ps17.7-CII konstitutiv Granula bildeten (Lubaretz, 2002). Da die endogenen sHSPs im untersuchten Gewebe der „reifen“ Zwiebelknolle bereits vorlagen, würde eine Behandlung der Zwiebelzellen mit Cycloheximid zu keinem Effekt führen, wie er in Tabakprotoplasten dokumentiert wurde. Durchgeführte Testexperimente zeigten, dass Cycloheximid keinen Effekt auf die Granula Verteilung hatte (Daten nicht gezeigt). Auch der beschriebene Effekt, dass sHSPs der Klasse 1 die HSG Bildung unterdrücken (Löslichkeit erhöhen), konnte nicht reproduziert werden. Neben dem Problem der endogenen sHSPs kam hinzu, dass beide Proteine von demselben Promotor gesteuert wurden. Daher war davon auszugehen, dass die Transkriptions- und Translationsraten beider Produkte vergleichbar waren. Neben den erwähnten möglichen Gründen (Speichergewebe, N-terminales Fluoreszenzprotein), wurde eventuell nicht eine bestimmte Klasse 1 zu Klasse 2 Ratio erreicht, um eine Granula lösenden Effekt auszulösen (Siddique et al., 2003). Natürlich ist auch nicht auszuschließen, dass At17.7 aufgrund endogener sHSPs keine Granula bilden konnte.

In allen Fällen, außer für At17.6-CII nur im geringeren Maß, wurde zusätzlich Fluoreszenz im Zellkern beobachtet. Dies wurde bereits für eine Vielzahl anderer



Mitglieder der zytosolischen sHSP Klassen 1 - 7 dokumentiert (Wollgiehn et al., 1994; Kirschner et al., 2000; Siddique et al., 2008). Da die sHSPs der nuklearen Klasse 3 extra ein NLS besitzen und daher ebenfalls im Kern vorliegen, ist die nukleare Funktion der eigentlich zytosolischen lokalisierten sHSP-Klassen weiterhin nur vage definiert (Siddique et al., 2003).

Nach Bestätigung der gleichen subzellulären Lokalisation im pflanzlichen Zytoplasma wurden Interaktionsanalysen in Hefen durchgeführt. Während der Hefe 2-Hybrid Analyse wurden allgemeine Interaktionsmöglichkeiten von verschiedenen vorher definierten monomeren sHSP Kombinationen bei der Dimerbildung getestet. Wie im Ergebnisteil angedeutet, wurde diese umfassende Analyse unter vier verschiedenen Gesichtspunkten (siehe Ergebnisse: Dimer Varianten a - d) durchgeführt.

Es wurden viele verschiedene dimere Formen nachgewiesen. Neben Homodimeren waren Heterodimere, welche aus Mitgliedern der gleichen Klasse gebildet werden konnten, vorhanden. Es wurden keine Interaktionen zwischen monomeren sHSPs der zwei verschiedenen zytosolischen Klassen 1 und 2 nachgewiesen. Die sHSPs ohne N-Terminus zeigten ein eher schwaches Interaktionsverhalten im Hefe 2-Hybrid System. Die Uniformität der erhaltenen niedrigen Messwerte ließ vermuten, dass auch die klassenspezifische Diskriminierung eingeschränkt war, daher möglicherweise dem klassenspezifischen N-Terminus unterlag. Da die Dimerisierung im Allgemeinen beeinträchtigt war, konnte mit der verwendeten Methode nicht näher differenziert werden, ob eine schwache unspezifische Interaktion gerade noch vorlag oder eben nicht. Dies war teilweise überraschend, da für die Dimerisierung der N-Terminus nicht besonders wichtig erschien. Es war den veröffentlichten Strukturen zu entnehmen, dass der N-Terminus eine stabilisierende Funktion zwischen verschiedenen Dimeren in einer tetrameren Konformation übernimmt (van Montfort et al., 2001). An der dimeren Schnittstelle schienen Elemente der ACD, vor allem die variable Linkersequenz mit der  $\beta_6$  - Faltblattstruktur, für eine stabile Dimerisierung wichtiger (Abbildung 4).

Zusammenfassend ließ sich der durchgeführten Analyse entnehmen, dass interklassenspezifische Heterodimerisierungen als sehr unwahrscheinlich einzuordnen sind. Diese Ergebnisse stimmen mit erhaltenen Befunden aus Interaktionsanalysen mit kleinen Hitzestessproteinen aus anderen Pflanzen wie Erbsen und Tomaten überein (Lee et al., 1995; Kirschner et al., 2000). Nur sHSPs der nuklearen Klasse 3 konnten mit beiden zytosolischen Klassen 1 und 2 im Hefesystem interagieren

(Siddique et al., 2003). Ob Interaktionen zwischen den beiden untersuchten zytosolischen Klassen stattfinden können, wenn sHSPs der Klasse 3 vorliegen würden, wurde bisher nicht im Hefesystem geprüft.

Eine Tendenz zeigte sich, dass vor allem Homodimerisierungen stärker waren, im Vergleich gegenüber den meisten als positive Interaktionen eingestuften intraklassenspezifischen Heterodimerisierungen. Daher könnten sich durch die beobachteten Assemblierungspräferenzen, bestimmte als möglich erachtete heterodimere Kombinationen *in vivo* nie oder die Reaktionsgleichgewichte beachtend, nur zu einem sehr geringem Anteil ergeben. At17.4-CI passte nicht in dieses Erklärungsschema. Hier war das Bestreben der Homodimerisierung eindeutig geringer, als die Formierung eines Heterodimers (Interaktion mit At17.8). Ob diese Interaktion eine besondere physiologische Bedeutung erfüllt wird noch zu prüfen sein. Sie betraf zwei sHSPs, welchen auch von Hitze unabhängige Aufgaben nachgewiesen wurden (Kotak et al., 2007; Dafny-Yelin et al., 2008; Kim et al., 2011).

Nachdem die Grenzen der möglichen dimeren Strukturen bekannt waren, wurde die Interaktion von sHSPs der Klasse 1 und Klasse 2 mit gereinigten Proteinen *in vitro* untersucht. Der entscheidende Unterschied zu den diskutierten Hefe 2-Hybrid Untersuchungen war, dass die hier verwendeten sHSPs keiner aufgezwungenen monomeren Konformation wie im Hefe System unterlagen. In einer Affinitätschromatographie basierten *pull-down* Analyse wurde gezeigt, dass die exemplarisch ausgewählten Klasse 1 und Klasse 2 Beuteproteine (At18.1 und <sup>cut</sup>At17.6) mit allen ausgewählten sHSP Köderproteinen interagieren konnten. Interaktionspräferenzen gegenüber einer bestimmten Klasse waren bei den getesteten Proteinen nicht festzustellen. Die Interaktionsanalysen zeigten alle, dass Heterodimere aus Monomeren zweier verschiedener sHSP Klassen nicht geformt werden konnten. Hetero-Oligomere aus Mitgliedern von verschiedenen Klassen schon. Die erhaltenen Ergebnisse ließen keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu, welche der möglichen Strukturen (Dimere, Tetramere, Sextamere oder Dodekamere) letztendlich interagierten. Nur eine Interaktionsratio von 1:1 bis 1:2 ließ sich ableiten, sowie dass die erhaltenen Interaktionen zwischen verschiedenen sHSPs zu keinen größeren Umlagerungen innerhalb der gemessenen Sekundärstrukturen führten. Es wird weiterhin mit experimentellen Schwierigkeiten verbunden sein, zu unterscheiden

ob sHSPs in Pflanzen unter nativen Bedingungen als Oligomere, aufgebaut aus Heterodimeren oder aus Homodimeren zweier verschiedener sHSPs, vorliegen.

## 4.2 Strukturanalyse

Damit sHSPs Klienten vor thermisch induzierter irreversibler Aggregation schützen können, müssen diese bei hohen Temperaturbedingungen, welche den Klienten denaturieren, stabil (löslich) und funktionsfähig bleiben. Erste Analysen der sHSP Löslichkeit bei hohen Temperaturen zeigten, dass diese im Vergleich zu den getesteten Klienten (MDH und CPH1 $\Delta$ 2) selbst bei extremen Temperaturbedingungen (bis 80 °C) löslich blieben und nicht aggregierten. Damit waren die getesteten sHSPs ähnlich stabil wie die prokaryotischen sHSPs aus dem hyperthermophilen Organismus *M. jannaschii* (Kim et al., 2003). Die in dieser Analyse erhaltenen Ergebnisse ließen aber keine Rückschlüsse auf die Struktur der sHSPs bei verschiedenen Temperaturen zu. Für sHSPs aus Tieren oder sHSPs aus Chloroplasten wurden Aktivitätssteuerungen über Phosphorylierung oder Redox-Potential beobachtet, doch die darin involvierten N-terminal liegenden Sequenzen (Motive) waren in den hier untersuchten sHSPs nicht vorhanden (Harndahl et al., 1999; Rogalla et al., 1999; Harndahl et al., 2001). Manche Veröffentlichungen schlagen eine eventuell temperaturabhängige Aktivierung von sHSPs vor, welche diese von einem passiven nicht schützenden, in einen aktiven schutzbereiten Zustand versetzen (Fu and Chang, 2004; Hilario et al.). Dieser postulierte Aktivierungseffekt könnte sich auf verschiedenen für Proteinstrukturen definierbaren Ebenen zeigen, so dass der Temperatureinfluss auf diese getestet wurde. Die durchgeführte Sekundärstrukturanalyse bestätigte eindeutig bisherige für pflanzliche sHSPs erhaltene Ergebnisse (Kim et al., 2003), sowie unsere Beobachtungen der Aggregationsanalyse. Temperaturerhöhungen bis 80 °C hatten bei den getesteten sHSPs keinen irreversiblen optischen Rotationsverlust (Sekundärstrukturverlust) zur Folge. Das vergleichend verwendete Klient (MDH) zeigte bei Temperaturen über 40 °C einen aggregationsbedingten irreversiblen Rückgang der optischen Lichtdrehung. Lediglich chemische Denaturierung von sHSPs mit GuHCl führte zu einer Abnahme

des optischen Rotationsvermögens. Die Spektren betrachtend waren Verschiebungen bei 80 °C in fast allen sHSP Spektren zu beobachten, außer in nur vermindertem Maße bei  $_{\text{His6}}\text{At17.4}$  und  $_{\text{His6}}\text{At17.6}$ . Bei den meisten sHSPs waren die beobachteten Verschiebungen unter *Recovery* Bedingungen mehr oder weniger fast vollständig reversibel. Die Deletion eines Klasse 2 N-Terminus ( $_{\text{His6}}\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$ ) führte zu einer leichten temperaturinduzierten, nicht reversiblen Änderung der optischen Lichtdrehung im Vergleich zu seinem *full-length* Protein ( $_{\text{His6}}\text{At17.6-CII}$ ). Trotz allem waren die beobachteten Sekundärstrukturen vor allem im für Pflanzen physiologischen Temperaturbereich sehr stabil, so dass ein auf sekundärstruktureller Ebene sich widerspiegelnder Aktivierungseffekt nicht beobachtet werden konnte. Aufgrund der flexiblen und dynamischen Eigenschaften, waren Strukturuntersuchungen von sHSPs aus verschiedenen Organismen schwierig. So waren vor allem Röntgenstrukturanalysen kompliziert, da der extrem flexible N-Terminus eine geordnete Kristallisierung von sHSPs behinderte (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001). Zusätzlich mit weiteren vorhandenen NMR- und CD-Spektroskopischen Untersuchungen ergibt sich mittlerweile ein übersichtlicheres Bild von verschiedenen sHSP Strukturen (Jehle et al., 2010). Wie Sequenzanalysen schon nahelegten bestätigten diese, dass sHSPs verschiedener Klassen sich vor allem im N-Terminus unterschieden, während in den stark konservierten Bereichen der ACD die beobachteten Strukturen vergleichbar waren (Poulain et al., 2010). Die ACD und CTE beinhalteten nur  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta_2$  -  $\beta_{10}$ ), während der N-Terminus zusätzlich helikale Struktureinflüsse zeigte (siehe Abbildung 40). Klasse 2 Proteine scheinen im N-Terminus weniger helikale Strukturen auszubilden. Die untersuchten sHSPs zeigten erwartungsgemäß deutliche Einflüsse von  $\beta$ -Faltblättern, aber auch von helikalen Strukturen (Kim et al., 1998; Van Montfort et al., 2001; van Montfort et al., 2001). Die Klasse 2 Deletion zeigte ein deutlich verändertes Rotationsspektrum, so dass zu vermuten war, dass durch das Abtrennen des N-Terminus auch sekundärstrukturell prägende Elemente verloren gingen. Obwohl scheinbar nur wenige sekundäre Strukturelemente vom Klasse 2 N-Terminus gebildet werden (im Vergleich zu Klasse 1), war das Spektrum der Klasse 2 Deletion ( $\text{At17.6}\Delta\text{N-CII}$ ) als einziges unverwechselbar. Die Deletion resultierte in einer Abnahme der positiven optischen Rotation, mit einem Verschwinden des positiven Peaks und einer Verschiebung des negativen Maximums zu niedrigeren

Wellenlängen. Scheinbar wurde die Rotationswirkung der  $\beta$ -Faltblätter in der ACD und CTE sekundärstrukturell bestimmend.

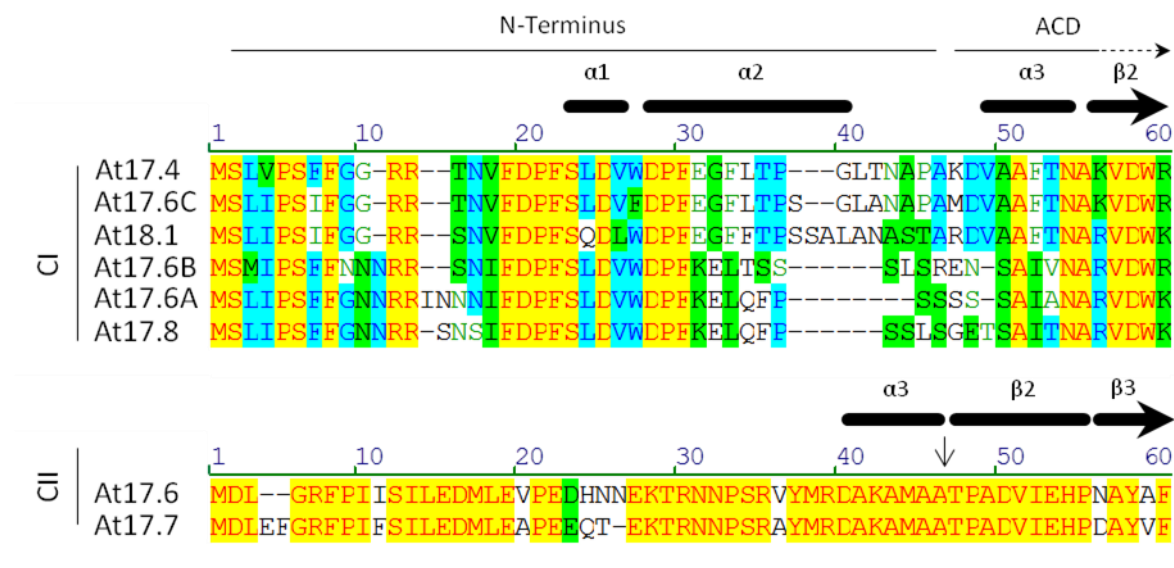


Abbildung 40: Liste der untersuchten Klasse 1 und Klasse 2 sHSP Aminosäuresequenzen des N-Terminus

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der untersuchten sHSPs wurden vergleichend dargestellt. Abschnitte die eine bestimmte Sekundärstruktur bilden wurden markiert nach (Basha et al., 2011). Der Pfeil markiert die Position der Deletion.

Die Unterschiede einzelner Spektren innerhalb von Klasse 1 waren so divers, dass eine Definition für ein typisches Klasse 1 oder Klasse 2 Spektrum schwierig war. Daher ließ sich allgemein nur festhalten, dass die hier erhaltenen Ergebnisse keine einheitlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen sHSP Klassen zeigten, so dass eine prinzipielle Ähnlichkeit repräsentiert durch die stark konservierte ACD zu vermuten war (Poulain et al., 2010). Lediglich ein verminderter Einfluss der applizierten Temperatur auf die beobachtete Sekundärstruktur bei Klasse 2 *full-length* Protein im Vergleich zu Klasse 1 Proteinen ließ sich feststellen. Die für das sHSP der Klasse 2 gemessenen Sekundärstrukturen erschienen stabiler oder weniger flexibel.

Ein weiterer umfassender Analysepunkt war die Dokumentation der quartären Struktur der in der Interaktions- und Stabilitätsanalyse untersuchten gereinigten sHSPs. Zunächst wurden Oberflächendynamiken der sHSPs bei verschiedenen Inkubationstemperaturen untersucht. Ein sehr nützliches und häufig verwendetes Hilfsmittel war der Fluoreszenzfarbstoff bis-ANS, welcher erst nach Bindung an hydrophobe, kationische Oberflächen nachweisbar ist (Shi et al., 1994). Zur Etablierung des gewählten Testsystems wurden die in verschiedenen Analysen vergleichend untersuchten Klienten getestet. Im Gegensatz zum bereits gut

dokumentierten MDH, welches erst unter Einfluss von denaturierenden Bedingungen bis-ANS bindet (Lee et al., 1997), zeigte das vergleichend verwendete und leicht temperaturstabilere CPH1 $\Delta$ 2 hohe „bis-ANS Bindung“ schon bei 25 °C. Da CPH1 $\Delta$ 2 relativ starke Absorption bei der genutzten Anregungswellenlänge für bis-ANS (314 nm) besitzt (siehe Spektrum von CPH1 $\Delta$ 2), können Artefakte wie Eigenfluoreszenz des Chromophors nicht ausgeschlossen werden. Also war bis-ANS in diesem Falle nicht geeignet eine Denaturierung dieses Klienten zu dokumentieren.

Für sHSPs wurden verschiedene funktionale Zustände vorgeschlagen. Auf der einen Seite einen normalerweise inaktiven, nicht schützenden Zustand, auf der anderen einen aktivierten Zustand, welcher in der Lage ist andere denaturierende Proteine (Klienten) zu binden und vor Aggregation zu schützen. In Pflanzen war bisher bekannt, dass sHSPs keine nativen Proteine binden (Lee et al., 1997; Eisenhardt, 2012). Ob ein Aktivierungseffekt benötigt wird oder allein die Denaturierung des Klienten ausreicht, damit sHSPs das Klient binden kann, ist immer noch offen. Es lassen sich für sHSPs typische Temperatur induzierte strukturelle Oberflächenveränderungen dokumentieren, welche als Aktivierungen interpretiert werden könnten (Lee et al., 1997; Jaya et al., 2009). Eine Möglichkeit der sHSP Aktivierung wurde in der temperaturinduzierten Dissoziation der Oligomere gesehen, eine andere allgemeinere in den temperaturabhängigen Änderungen der sHSP Oberflächen (Benesch et al., 2008). Beide beschriebene Effekte könnten sich einander bedingen, indem die Oligomerdissoziation zu einer Zunahme der Hydrophobizität führt. Da aber auch Klasse 2 Proteine bei erhöhten Temperaturen mehr bis-ANS binden können, aber nicht so schnell dissoziieren wie Klasse 1 Proteine, scheint für diese Klasse kein direkter Zusammenhang zwischen temperaturabhängiger Oberflächenhydrophobizität und Untereinheitenanzahl zu bestehen (Basha et al., 2011). Wie in dieser Publikation und im Ergebnisteil für At18.1-CI gezeigt, führten erhöhte Temperaturen zu einer Dissoziation des bei 25 °C beobachteten Oligomers zu Dimeren. Ein Vergleich mit der bis-ANS vermittelten Fluoreszenz zeigte ebenfalls eine temperaturbedingte Zunahme. Diese Ergebnisse deuteten auf einen Zusammenhang zwischen Oberflächenhydrophobizität und Oligomerisierungszustand für zu mindestens für Klasse 1 Proteine hin, doch eine weitere Komplettierung dieser Analysen mit His6-Epitop tragenden und mit dem TEV-Protease geschnittenen sHSPs der Klasse 1 und 2 zeigten ein deutlich komplexeres Bild.

Es wurde zunächst vermutet, dass Temperatur induzierte Strukturänderungen bis-ANS Bindung an zuvor im Proteinkern verborgenen hydrophoben Strukturen ermöglicht. Doch erste Resultate mit den erwähnten His6-Epitop tragenden sHSPs, welche unabhängig von Temperatur konstant hohe Mengen an bis-ANS banden und keine Temperatur induzierte Dissoziation zeigten (<sub>His6</sub>At18.1), widersprachen dieser These. Auch die getesteten At17.8 Versionen zeigten unter bestimmten Temperaturbedingungen einen großen Anteil an Proteinen, welche als Dimere vorlagen. Aber die Epitop versehene At17.8 Version hatte mehr bis-ANS als die TEV-Protease geschnittene Version gebunden. Es waren aber keine Unterschiede zwischen den beiden Proteinversionen in der temperaturbedingten Oligomerverteilung feststellbar. Daraus ließ sich folgern, dass in diesen Fällen, die N-terminale Modifikation die bis-ANS Bindung beeinflusste, nicht der Oligomerisierungszustand.

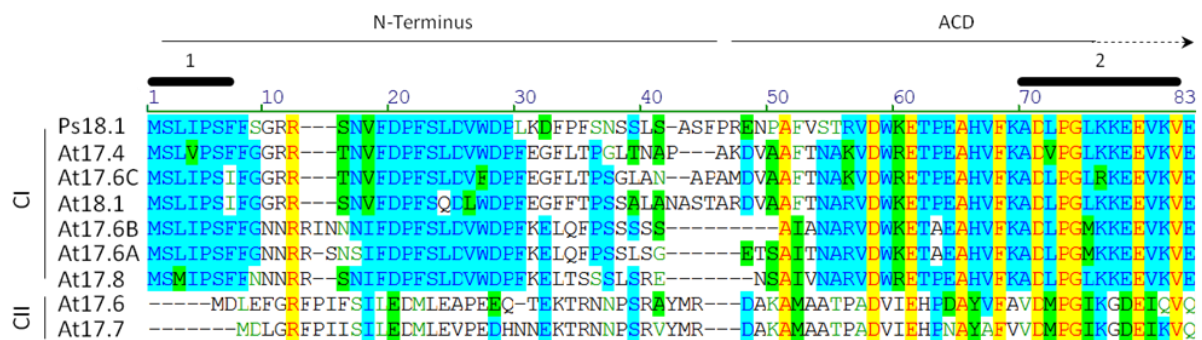


Abbildung 41: bis-ANS Bindestellen der untersuchten Klasse 1 und Klasse 2 sHSP

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der untersuchten sHSPs wurden vergleichend dargestellt. Die an Ps18.1 identifizierten zwei bis-ANS Bindestellen wurden mit Ziffern und Balken markiert nach (Lee et al., 1997).

Anhand früherer Untersuchungen, ließen sich zwei bis-Ans Bindestellen in sHSPs und ihren verwandten alpha-Kristallinen definieren (Lee et al., 1997; Sharma et al., 1998). Bei pflanzlichen sHSPs befand sich eine Bindestelle im vorderen N-terminalen Abschnitt, die andere in der ACD (zwischen  $\beta 3$  -  $\beta 4$ ; Abbildung 41). Normalerweise assemblieren sHSP Monomere zu Dimeren. Wie weiterhin beschrieben, wird das Tetramer durch die Interaktionen des N-Terminus verschiedener Dimere stabilisiert (van Montfort et al., 2001). Das Anfügen des Epitops könnte eine bündige Interaktionsfläche vor allem bei der Tetramerbildung verhindern, so dass ein größerer innerer Hohlraum im Oligomer entsteht, welcher normalerweise durch stabile Interaktionen und passende Positionierung bei RT abgedeckt ist (Abbildung 42). bis-ANS könnte an die im entstandenen Hohlraum befindlichen Kontaktflächen binden. Es lässt sich nicht direkt ableiten, ob im Falle der His6-Epitop versehenen sHSPs die

sHSP typischen bis-ANS Bindestellen oder unspezifische, durch gestörte Kontaktflächenpositionierung freiliegende, hydrophobe Aminosäuren gebunden wurden. Wie erwähnt, war eine bis-ANS Bindestelle von bisherigen untersuchten sHSPs im N-Terminus lokalisiert worden (Abbildung 41), daher wurde eigentlich eine erkennbar geringere bis-ANS Bindung nach N-terminaler Deletion erwartet.

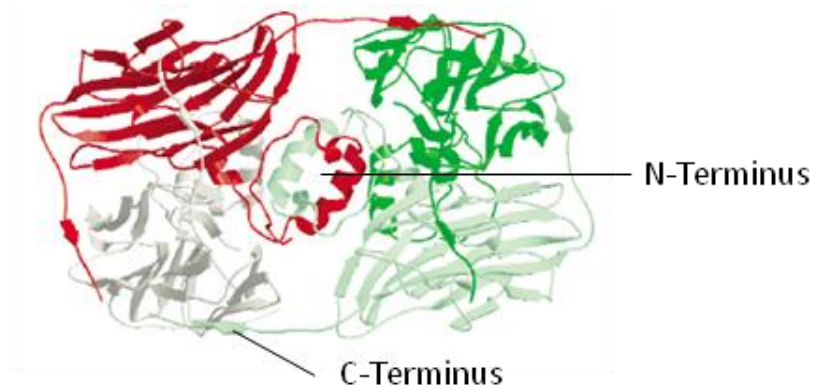


Abbildung 42: Strukturen eines eukaryotischen sHSP Tetramer

Die Abbildungen wurden (van Montfort et al., 2001) entnommen. Dargestellt sind zwei Dimere (rot und weiß, sowie grün und blass-grün), bei der Assemblierung zu einem Tetramer. Wie zu ersehen, wird diese Struktur zum einen durch C-terminale Verbindungen gestützt und zusätzlich durch eine Verbindung verschiedener N-Termini in einem Hohlraum zwischen der Dimer / Dimer Schnittstelle.

Da die Deletion des N-Terminus zu keiner Abnahme der bis-ANS Bindung führte, wenn nicht gleichzeitig auch das Epitop abgeschnitten wurde (siehe At17.6 und At17.6 $\Delta$ N mit Epitop oder TEV-Protease geschnitten) deutete dies bei den bisher beobachteten hohen bis-ANS Bindungen auf eine bis-ANS Einlagerung in normalerweise unzugängliche Strukturen. Eine direkte Bindung an das His6-Epitop konnte nicht ausgeschlossen werden, aber ein Vergleich mit anderen Studien zeigte, dass ein His6 Epitop normalerweise nicht das bis-ANS Bindungsverhalten beeinflusst (Feng et al., 2002). In Fortführung der erstellten Theorie würde das Entfernen des Epitops eine bündige Interaktion zwischen den Dimeren wieder herstellen, wobei damit die für bis-ANS zugänglichen Flächen minimiert und erst bei erhöhten Temperaturen wieder zugänglich wurden. Dies würde dann in der beobachteten Abnahme der bis-ANS Bindung bei TEV-Protease geschnittenen sHSPs resultieren. Die erhaltenen Ergebnisse stützen diese Theorie wenn das Verhalten der geschnittenen sHSPs unter RT Bedingungen untersucht wurde. Die Temperatur induzierte Zunahme der bis-ANS Bindung wie für einige sHSPs von verschiedenen Pflanzen beschrieben (Basha et al., 2011), war für die geschnittenen Versionen nicht reproduzierbar. Nur At18.1, welches direkt ohne Epitop produziert wurde, zeigte das zu erwartende Verhalten. Da der TEV-Protease Verdau einen Überhang von 4 AS



vor der eigentlichen ersten AS (Methionin) lässt, schienen diese verantwortlich für die unterdrückte bis-ANS Bindung bei erhöhten Temperaturen. Allgemein ließ sich festhalten, dass die verwendeten His6-Epitop versehenen sHSPs durch die hohe „Start“-Fluoreszenz bei 25 °C nicht geeignet waren, bisher dokumentierte temperaturinduzierte Freilegung von bis-ANS Bindeflächen mit nötiger Präzision zu reproduzieren.

Die quartäre Struktur der untersuchten sHSPs betrachtend, war die Anzahl der Untereinheiten nicht einheitlich. Die Untereinheitenanzahl war in einigen Fällen temperaturabhängig (At18.1, <sup>His6</sup>At17.8), in jedem Fall aber immer eine gerade Zahl, abgesehen von gelegentlich auftretenden monomeren Spezies (At17.4-CI / At17.6B-CI / At17.7-CII). Bestimmte quartäre Strukturen traten häufiger auf (2, 12, 18-24). Auffällig war, dass At17.4 und At17.6B aus bis zu 24 Untereinheiten bestanden, vergleichbar zu prokaryotischen sHSPs (Kim et al., 1998). Ebenfalls ungewöhnlich und erst kürzlich beschrieben war das hauptsächlich als Dimer vorliegende At17.8 (Kim et al., 2011). Die übrigen sHSPs bildeten oligomere Strukturen, welche wahrscheinlich dodekamere waren (van Montfort et al., 2001). Neben den erwähnten sequentiellen Unterschieden, zeichnen sich pflanzliche Klasse 1 und 2 Mitglieder vor allem durch zwei strukturelle Hauptunterscheidungsmerkmale aus. In der Regel dissoziiert ein Klasse 1 sHSP bei hohen Temperaturen zu Dimeren, während ein Klasse 2 Protein nicht in Dimere zerfällt, sondern in manchen Fällen Tetramere und Oktamere zeigt (Basha et al., 2011; Stengel et al., 2011).

Hier waren zwischen dem Klasse 1 <sup>His6</sup>18.1 und At18.1, sowie im Besonderen bei Klasse 2 Unterschiede feststellbar. Die mit Epitop tragenden sHSPs erhaltenen Ergebnisse zeigten genau den entgegengesetzten Fall. Das Klasse 1 sHSP <sup>His6</sup>18.1 dissoziierte nicht, während <sup>His6</sup>At17.6-CII eine temperaturabhängige quartäre Struktur zeigte. Das Epitop schien darauf hinzuweisen, dass der N-Terminus einen Einfluss auf die Temperaturabhängigkeit der beobachteten Struktur hatte und diese beeinflusste.

Daher wurde die N-Terminale Region einer weitergehenden Analyse unterzogen. Es wurde getestet, ob dieser klassendefinierende Abschnitt sich für einige bisher beschriebene Charakteristika verantwortlich zeigte. sHSPs zweier Klassen, welche sich deutlich in ihrer quartären Struktur unterschieden wurden ausgewählt. Es wurden At17.8 (hauptsächlich als Dimer vorliegend) und At17.6 (vorliegend in vielen verschiedenen Strukturen) gewählt um zum einen, den N-Terminus zu entfernen,

zum anderen einen Klasse 2 N-Terminus mit der N-terminalen Deletion von At17.8 zu rekombinieren (Chimäre). Die Deletionen hatten hinsichtlich der untersuchten Klasse 1 und Klasse 2 Proteine unterschiedliche Auswirkungen.  $_{\text{His6}}\text{At17.8}\Delta\text{N}$  zeigte bei allen Temperaturen verstärkte Oligomerbildung, während  $_{\text{His6}}\text{At17.6}\Delta\text{N}$  weniger differenzierbare Strukturen im Vergleich zu seiner *full-length* Version hatte. Die Analysen bestätigten, wie für andere pflanzlichen sHSPs beschrieben (siehe Zusammenfassende Übersicht in Abbildung 43), dass der N-Terminus (~AS 1 - 45) nicht direkt für die Bildung von Dimeren, sowie höheren molekularen Strukturen essentiell war (Giese, 2002).

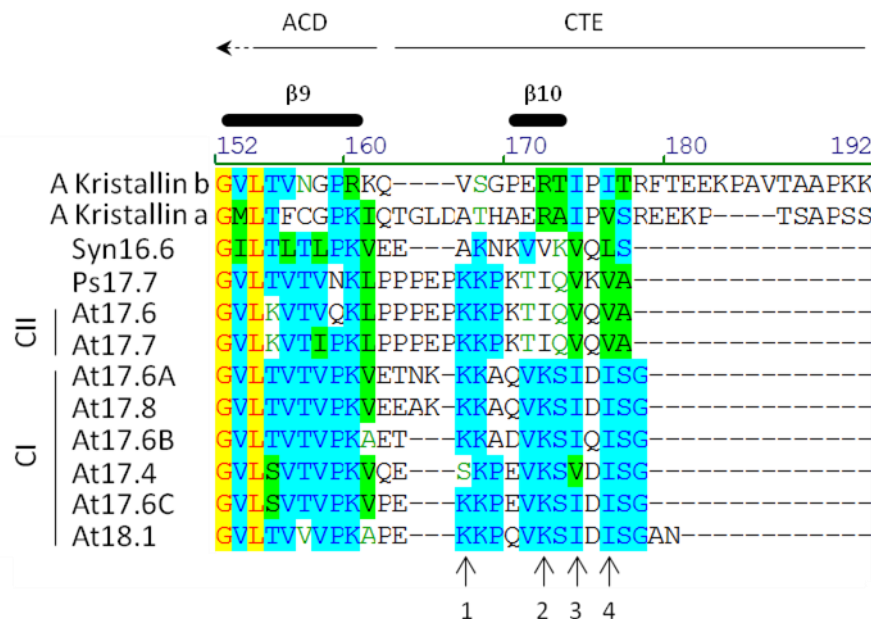


Abbildung 43: Darstellung einiger verschiedener bisher beschriebener Modifikationen in der CTE

Pfeile markieren Positionen bisher veröffentlichter Deletionen bzw. Stellen an denen Aminosäuren ausgetauscht wurden. Positionen Nummer 3 und 4 liegen innerhalb des stark konservierten IXI/V Motivs. Bei alpha-Kristallinen Proteinen (A-Polypeptid und B-Polypeptid) führte ein Aminosäureaustausch zu Glyzin (an Position 3 und 4), zu keiner Dissoziation des beobachteten Oligomers. Synechocystis HSP16.6 (Syn16.6) Oligomere lagen als Dimere nach Aminosäure Austausch von Position 3 vor. Schrittweises Entfernen des C-Terminus (Positionen 1, 2, 3), führte zu einer schrittweisen Reduzierung der Größe der beobachteten Oligomere. Erst Deletionen bis zu Position 1 führten zu einer kompletten Dissoziation zu Dimeren. Positionen der Modifikationen wurden der Literatur entnommen (Kirschner et al., 2000; Giese and Vierling, 2004; Pasta et al., 2004).

Bei At17.8 unterstützte das Entfernen des N-Terminus ( $\text{At17.8}\Delta\text{N}$ ) und der Austausch von diesem mit einem Klasse 2 N-Terminus (Chimäre) die Bildung von Oligomeren. At17.6A und At17.8 sind in der CTE vom Sequenzende bis zur in Abbildung 43 angezeigten Position 1 identisch. At17.6A lag als Oligomer vor, daher scheint im Falle von At17.8 der N-Terminus dafür verantwortlich, dass dieses sHSP hauptsächlich als Dimer vorliegt. Das entfernen des N-Terminus bestätigte ( $\text{At17.8}\Delta\text{N}$ ), dass die ACD und CTE von At17.8 ausreichte um Oligomere zu bilden.

Der N-Terminus von At17.8-CI, war in diesem Fall indirekt verantwortlich für die Dimere Struktur, indem er über den Oligomerisierungseinfluss des C-Terminus dominierte. Eine genaue Untersuchung und Definierung des Einflusses des N-Terminus auf allgemeine sowie temperaturinduzierte Oligomergröße war aufgrund der sehr diversen Wirkung des Epitops auf verschiedene sHSPs nicht möglich. Letztendlich zeigten diese Analysen nur, dass die Feinstrukturen der zahlreichen Mitglieder der beiden zytosolischen Klassen vielfältiger waren als die Ähnlichkeiten der Sequenzen vermuten ließen. Der Einfluss des N-terminalen Epitops war nicht klassenabhängig, sondern zeigte je nach ausgewählten sHSP einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die durchgeführten Strukturanalysen. Das Epitop schien stärker die Temperatur abhängigen sHSP Dynamiken zu beeinflussen, als die Anzahl der beobachteten Untereinheiten bei RT. Wenn auch sHSP Strukturanalysen mit Epitop tragenden sHSPs Schwierigkeiten offenbarten, so erbrachten diese Konstrukte im Vergleich zu ihren nativeren Varianten, vor allem in Bezug auf die nachfolgend diskutierte Funktionsmechanismen, wichtige neue Einblicke.

#### **4.3 Funktionsanalyse**

Alle untersuchten sHSPs waren unabhängig ihrer Klassenzugehörigkeit in der Lage, ein in Denaturierung befindliches Protein (Klient) zu binden, in Lösung zu halten und vor irreversibler Aggregation zu schützen. Weiterhin waren die getesteten sHSPs sehr stabil und konnten wie HSP16.5 vom hyperthermophilen Organismus *M. jannaschii*, bei sehr hohen Temperaturen (80 °C) vor Denaturierung schützen (Kim et al., 1998). Wie auch in den hier präsentierten CD-Spektroskopischen Analysen zu entnehmen, waren Temperatur induzierte sekundärstrukturelle Änderungen vor allem beim Klienten und nicht bei den sHSPs zu beobachten gewesen, so dass manche Analysen vermuteten, dieser Effekt sei wichtig für die Klienten Erkennung (Kim et al., 2003). Die Protektionsanalysen an zwei unterschiedlichen Klienten (MDH und CPH1Δ2) zeigten für das jeweilige getestete Protein Gemeinsamkeiten. At17.8 konnte beide Klienten sehr gut schützen, At17.6B war in beiden Fällen ineffizienter. Trotzdem bildeten beide sHSPs charakteristische sHSP / Klienten Komplexe aus. Bis-ANS Bindungskompetition mit sHSPs und MDH unter denaturierenden

Bedingungen deuteten darauf hin, dass At17.8 und At17.6B an MDH mit den gleichen sHSP Abschnitten banden, welche auch bis-ANS binden können (Eisenhardt, 2012). Die Ergebnisse spiegelten unterschiedliche Bindungspräferenzen wieder, eventuell ausgelöst durch unterschiedlich effiziente Klienten Bindungsstellen oder unterschiedlich effizienter Exposition dieser Bindungsstellen. Eventuell konnte At17.8 seine Klienten Bindungsstelle besser präsentieren als At17.6B, so dass dieses sHSP eine bessere Bindeeffizienz mit beiden Klienten zeigte. Beide getesteten Proteine waren tierischen oder bakteriellen Ursprungs, so dass der beobachtete Schutzeffekt, wie der allgemein beobachtete Mechanismus der Klienten Inkorporierung in hoch molekulare Komplexe (Stromer et al., 2003), wahrscheinlich durch allgemeine Signale (Strukturen) hervorgerufen wurde. Eine weitere für verschiedene sHSPs diskutierte Frage war die Bedeutung der Dissoziation der Oligomere. Bei diesen untersuchten sHSPs aus Pflanzen, zeigten die Temperatur induzierten Dissoziationen keinen Vorteil für die Klientenbindung. Vor allem At18.1 verglichen mit <sub>His6</sub>At18.1 zeigte, dass das Epitop tragende sHSP nicht bis 45 °C dissoziierte, während At18.1 komplett als Dimer vorlag. Trotzdem wirkten beide sHSPs ähnlich schützend auf MDH, obwohl sie unterschiedliches Dissoziationsverhalten zeigten. Es wurde auch gezeigt, dass alle sHSPs nach Vorbehandlung bei 80 °C in hauptsächlich dimeren Strukturen vorlagen, aber immer noch Schutzfunktion erfüllten. Man kann zu mindestens festhalten, dass die Dimere ausreichen ein minimales Chaperon zu bilden (Dudich et al., 1995). Aber für Klasse 1 scheint Dissoziation nicht notwendig zu sein, so lange Klienten Bindungsflächen zugänglich sind (siehe <sub>His6</sub>At18.1). Für Klasse 2 waren Dissoziation ungewöhnlich, so dass ein dissoziationsunabhängiger Mechanismus für diese Klasse als wahrscheinlich gilt (Basha et al., 2011).

Letztendlich können aber alle *in vitro* Analysen nichts über die wirkliche Situation im Organismus sagen. So wurde für einige modifizierte sHSPs *in vitro* Chaperonaktivität nachgewiesen, konnten aber keine durch Mutationen in Thermotoleranz eingeschränkte Organismen *in vivo* komplementieren. Letztendlich müssen Klienten unter *Recovery* Bedingungen aus den sHSP / Klienten Komplexen freigelassen werden, was durch leicht dissoziierende sHSPs unterstützt würde (Giese, 2002; Basha et al., 2004; Giese et al., 2005). Ob die hier verwendeten Epitop tragenden sHSPs Probleme bei der HSP70 vermittelten Freisetzung der eingebunden Klienten zeigen, sollte in Zukunft ermittelt werden.

Die durchgeführten Analysen bestätigten, dass die von sHSPs unter denaturierenden Bedingungen löslich gehaltenen Klienten keine Aktivität mehr zeigten. Zusammen mit dem getesteten CPH1Δ2, welches im Verbund mit sHSPs löslich blieb, den Chromophor behielt (nachgewiesen durch ZnAc Färbung) aber keine Absorption im roten Lichtbereich und keine Fotokonversion mehr zeigte, war abzuleiten, dass sHSPs die Klienten in einer Konformation eingebunden hatten, die keine Funktionalität oder Aktivität des Klienten erlaubte. Die Klienten wurden stabil gebunden, so dass sie nicht von alleine aus dem Verbund gelöst werden konnten.

In einem MDH und HRP nutzenden kombinierten Ansatz wurde eine Art zelluläre Situation simuliert, um die physiologische Funktion von sHSPs zu rekapitulieren. Nachdem gezeigt wurde, dass HRP bis 70 °C relativ thermisch stabil war, aber labileres MDH zu HRP Inaktivierung führte (vermutlich durch unspezifische MDH und HRP Interaktionen), konnte sHSP Zugabe die HRP Aktivität zu einem gewissen Grade „wiederherstellen“. Dieses Experiment verdeutlicht den indirekten ATP-unabhängigen Schutzeffekt der kleinen sHSPs. Durch Aggregationsprävention thermisch labiler Proteine wird ermöglicht, dass thermisch stabilere Proteine weiterhin funktionieren und nicht in unspezifische Aggregationen hineingezogen werden. Weiterhin bestätigten diese Ergebnisse, dass alle sHSPs im Gegensatz zu MDH, bei den getesteten 70 °C stabil waren und nicht unspezifisch mit HRP interagierten.

Eine durch positive Interaktionen vermittelte Thermotoleranz in Hefen konnte nicht nachgewiesen werden. Obwohl die in den Hefevektoren vorliegenden ADH Promotoren vom Hersteller (Clontech) als stark konstitutiv aktiv beschrieben wurden, zeigten exemplarisch durchgeführte Proteinextraktionen aus transfiszierten Hefen mit anschließendem Western-Blot (verwendete Antikörper α-CI, α-CII, α-myc, α-HA) einen im Vergleich zu anderen zellulär vorhandenen Proteinanteilen vernachlässigbaren sHSP Gesamtanteil (nicht gezeigt). Wie in der Einleitung beschrieben können sHSPs unter bestimmten Bedingungen einen hohen Anteil (~1-2%) am Gesamtproteinanteil ausmachen, so dass fehlende Thermotoleranz vielerlei Gründe haben kann. In Zukunft würden sich andere bereits besser etablierte Testsysteme in *E. coli* (Thomas, 1998; Soto et al., 1999), *Synechocystis* sp. (Giese, 2002) oder Tabak Protoplasten (Sanmiya et al., 2004) anbieten.

#### 4.4 Gesamtbetrachtung / Ausblick

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass es keinen einzigen Analysepunkt gab, in dem sich Klasse 1 und Klasse 2 tatsächlich so stark voneinander unterschieden, dass unabhängig von Sequenzanalysen eine universale Definition zur Klassenunterscheidung anhand der dokumentierten Eigenschaften möglich war. Die verschiedenen sHSP Klassen waren nur hinsichtlich ihrer Funktion als Chaperone sehr homogen und zeigten die dafür nötigen thermischen Stabilitäten, sogar weit über den normalen für Arabidopsis physiologischen Temperaturbereich von 38 - 45 °C hinaus (Queitsch et al., 2000). Die beobachteten Interaktionen zeigten, dass sHSPs in eine geordnete Struktur assemblieren mit einer geraden Anzahl an Untereinheiten, so dass das Dimer zurecht als Grundbaustein weiterer eventuell möglicher höher molekularer Strukturen gilt (Dudich et al., 1995). Eine generelle durch Temperatur induzierte Dissoziation von Klasse 1 Protein konnte nicht in allen Fällen dokumentiert werden. Genauso wenig ließ sich verallgemeinern, dass alle pflanzlichen sHSPs dodekamere Oligomere waren. Es gab Hinweise, dass der N-Terminus in Kooperation mit dem C-Terminus die Anzahl der Untereinheiten der quartären *in vitro* Struktur mitbestimmt. Anhand der N-terminalen Klasse 1 Deletion und der Chimäre war zu beobachten, dass die ACD und CTE für die Bildung von oligomeren Strukturen ausreichend waren. Die At17.8-CI Gesamtstruktur wurde aber durch den N-Terminus in eine Dimere Struktur gezwungen. Es stellt sich für die Zukunft vor allem die Frage der *in vivo* Relevanz der auf verschiedenen strukturellen Ebenen beobachteten Interaktionen und der Funktion der verschiedenen beobachteten oligomeren Formen. Generell wäre eine weitere Ausdehnung der *in vitro* Chaperonanalysen auf *in vivo* Untersuchungen sinnvoll. Gerade bei Analysen von mutierten sHSPs wurden bereits Unterschiede zwischen *in vitro* Chaperonaktivität und *in vivo* Schutzverhalten (Thermotoleranz) dokumentiert (Giese et al., 2005). Diese Ergebnisse deuteten auch darauf hin, dass die für *in vitro* Analysen genutzten Chaperonassays, eventuell nicht die wirkliche oder alleinige Funktion von sHSPs in der Zelle bei Hitzestress widerspiegeln. Auch zeigten aus Protoplasten isolierte sHSPs nicht unbedingt das gleiche *in vitro* beobachtete Gewicht. So ergab eine Überexpression von At17.6C-CI in Tabakprotoplasten nicht erklärbare kleine Oligomere mit einer Masse von nur 67 kDa (Kirschner et al., 2000). Inwiefern Interaktionen von sHSPs untereinander oder mit anderen zellulären

Bestandteilen die Oligomergröße steuern und welche Antwort oder Funktion dieses wiederum im zellulären System hat, bleibt offen. Die Frage nach Redundanz ergibt sich zwangsläufig. In den bereits erwähnten *E. coli* (Thomas, 1998; Soto et al., 1999), *Synechocystis* sp. (Giese, 2002) oder Tabak Protoplasten (Sanmiya et al., 2004) Systemen existieren vielfältige HSP Mutanten Linien mit messbaren Defekten in der Thermotoleranz, so dass Komplementationsstudien mit den hier untersuchten sHSPs möglich wären. Falls verschiedene der hier charakterisierten sHSPs unterschiedlich starke Komplementationen zeigen würden, könnte man anhand der erhaltenen Reihenfolge zielgerichteter *knock out* Linien von *A. thaliana* züchten. Bisherig erstellte Mutanten zeigten nur geringe phänotypische Auswirkungen (Dafny-Yelin et al., 2008), so dass eine Voreinteilung der vielfältigen sHSPs aufgrund zum Beispiel der erwähnten Fähigkeit zur Komplementation von Nutzen sein könnte. Für sHSPs der Klasse 3, sowie für HSFs, HSP101 und HSP70 / 40 konnten mehrere direkte und indirekte Hinweise gefunden werden, dass Mitglieder dieser Proteinfamilien mit sHSPs in vielfältiger Weise kooperieren können (Lee, 2000; Haslbeck, 2002; Port et al., 2004; Haslbeck et al., 2005; Tripp et al., 2009). In diesem Zusammenhang ließe sich das Interaktionsnetzwerk dieser kooperierenden Faktoren untersuchen. Eine Fortführung der vergleichenden Studie der N-Terminal modifizierten sHSPs, auch im Bezug auf das His6-Epitop, könnte zeigen ob dieser N-Terminale Abschnitt mit der Anlagerung und Rückfaltungsreaktion vom HSP70 / 40 Chaperonsystem interferiert. Unseren Studien war zu entnehmen, dass zu mindestens auf At17.8 das Epitop nur geringen Einfluss zu haben schien. In anderen Untersuchungen zu intrazellulären Proteinrelokalisierungen wurde bereits gezeigt, dass dieses sHSP ebenfalls mit Epitop versehen war und zu mindestens nicht in seiner dokumentierten Hitze unabhängigen *in vivo* Funktion gestört war (Kim et al., 2011). Da auch die Rekrutierung von Klasse 1 sHSPs in Klasse 2 Granula gestört war sollte getestet werden, ob die verwendete Proteinmodifikation (YFP oder CFP Fusion), die N-terminale Position dieser Fluoreszenzproteine oder das verwendete zelluläre System für die beobachteten Unterschiede verantwortlich war. In dem Zusammenhang kann untersucht werden, warum nur At17.6-CII Granula bildet und At17.7-CII nicht.

Eine weitere interessante, schwer einzuordnende Facette ist die entwicklungsspezifische Expression mancher Hitzestressproteine (Dafny-Yelin et al., 2008). Die meisten dieser Entwicklungsstadien, wie die pflanzliche Samenreifung

gehen mit einer Austrocknung des Samens einher (Lane, 1991). Mit dem Beginn der Dehydrierung verdichtet sich das Zytoplasma und intrazelluläre Komponenten rücken enger zusammen. Dies kann dazu führen, dass viele ungewünschte Interaktionen stattfinden können, die zu Aggregation, Denaturation und Organell / Zellmembranfusion führen (Manfre et al., 2008). sHSPs wurden mittlerweile in einer Reihe verschiedener Funktionen vorgefunden (Kotak et al., 2007; Kim et al., 2011), aber das Verhältnis von pflanzlichen zytosolischen sHSPs und Membranen wurde bisher weniger behandelt, obwohl in einigen Fällen Interaktionen schon nachgewiesen wurden (Torok et al., 2001; Tsvetkova et al., 2002; Coucheney et al., 2005; Zhang et al., 2005). Es wäre nicht ungewöhnlich, dass sHSPs unspezifische Interaktionen, ähnlich wie bei Hitze, verhindern sollen. Neben den sHSPs konnte gleichzeitige auch eine Akkumulierung sogenannter LEA („*Late Embryogenesis Abundant*“) Proteine beobachtet werden (Almoguera, 1992). Die entdeckten LEA Proteine wurden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und ihrer mRNA Homologien zueinander in sechs Familien eingeteilt (Hong-Bo et al., 2005). Bei einigen von ihnen wurde ebenfalls eine „Chaperonaktivität“ nachgewiesen, denn sie konnten diverse Modellsubstrate vor irreversibler Aggregation unter Wasserstress- und Kältestressbedingungen schützen (Manfre et al., 2008). Bisher ist unklar, warum zwei Chaperonsysteme mit scheinbar ähnlichen Funktionsweisen zum gleichen Entwicklungszeitpunkt vorliegen. Ob zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten vorliegende sHSPs eine ähnliche molekulare Funktionsweise zeigen wie bei der von Hitze abhängigen Einlagerung von Klienten beobachtet, wurde noch nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sHSPs nicht rein Hitze abhängig transkribiert wurden. Neben einigen Gemeinsamkeiten, wie die zelluläre Lokalisation, thermische Stabilität und den beobachteten Schutzmechanismus, waren die Unterschiede der beobachteten Strukturen divers. Daraus ließ sich ableiten, dass die vorliegenden Strukturen nicht entscheidend für die gezeigte *in vitro* Schutzfunktion der getesteten sHSPs waren. Die quartäre Grundstruktur bestand immer aus einer geraden Anzahl an Untereinheiten, wobei das Dimer ein Grundbaustein darstellte. Die Oligomerbildung wurde durch den C-Terminus gewährleistet, wobei der N-Terminus ebenfalls eine Untereinheitenanzahl bestimmende Funktion haben konnte. Im Fall von At17.8-CI, kontrollierte der N-Terminus indirekt die Dimerbildung, während der C-Terminus Oligomere bilden konnte. Auf die zytosolische Verteilung, Granulabildung



oder Chaperonaktivität hatte der N-Terminus geringen Einfluss. sHSPs bilden sehr wahrscheinlich im Zytosol ein Netzwerk miteinander interagierender Untereinheiten, wobei Interaktionen zwischen Klasse 1 und 2 nicht auf monomerer Ebene zu finden wären. Insgesamt gesehen, waren fast keine klassenspezifischen Eigenschaften zu finden gewesen, die von allen Mitgliedern einer Klasse geteilt wurden. Das offensichtlichste Beispiel war die fehlende Granulabildung von At17.7-CII. Lediglich eine leicht striktere Hitze abhängige Transkriptionskontrolle von Klasse 2 Genen wurde beobachtet.

## 5 Literaturverzeichnis

- Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM** (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6938-6947
- Almoguera C, Jordano, J.** (1992) Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and *Lea* mRNAs. *Plant Mol Biol* **19**: 781-792
- Andley UP, Mathur S, Griest TA, Petrash JM** (1996) Cloning, expression, and chaperone-like activity of human alphaA-crystallin. *J Biol Chem* **271**: 31973-31980
- Andley UP, Patel HC, Xi JH** (2002) The R116C mutation in alpha A-crystallin diminishes its protective ability against stress-induced lens epithelial cell apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 10178-10186
- Ayme A, Southgate R, Tissieres A** (1985) Nucleotide sequences responsible for the thermal inducibility of the *Drosophila* small heat-shock protein genes in monkey COS cells. *J Mol Biol* **182**: 469-475
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphylides C** (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J* **13**: 519-527
- Bartling D, Bülter H, Liebeton K, Weiler EW** (1992) An *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a 17.6 kDa class II heat shock protein. *Plant Mol Biol* **18**: 1007-1008
- Basha E, Friedrich KL, Vierling E** (2006) The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J Biol Chem* **281**: 39943-39952
- Basha E, Jones C, Wysocki V, Vierling E** (2011) Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J Biol Chem* **285**: 11489-11497
- Basha E, Lee GJ, Brexi LA, Hausrath AC, Buan NR, Giese KC, Vierling E** (2004) The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J Biol Chem* **279**: 7566-7575
- Basha E, O'Neill H, Vierling E** (2011) Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci* **37**: 106-117
- Benesch JL, Ayoub M, Robinson CV, Aquilina JA** (2008) Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure. *J Biol Chem*
- Bhat V, Dalton SJ, Kumar S, Bhat BV, Gupta MG, Morris P** (2001) Particle-inflow-gun-mediated genetic transformation of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters. *J Appl Genet* **42**: 405-412
- Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, Horwitz J** (1999) Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6137-6142
- Caspers GJ, Leunissen JA, de Jong WW** (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol* **40**: 238-248
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299

- Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T** (2006) Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J Mol Biol* **362**: 1120-1131
- Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert K, Wu C** (1990) Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* **63**: 1085-1097
- Correll K, J. Z.** (2005) The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol* **46**: 317-323
- Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, Guzzo J** (2005) A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim Biophys Acta* **1720**: 92-98
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY** (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455
- Dafny-Yelin M, Tzfira T, Vainstein A, Adam Z** (2008) Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **67**: 363-373
- de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA** (1998) Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* **22**: 151-162
- de Jong WW, Leunissen JA, Leenen PJ, Zweers A, Versteeg M** (1988) Dogfish alpha-crystallin sequences. Comparison with small heat shock proteins and *Schistosoma* egg antigen. *J Biol Chem* **263**: 5141-5149
- de Jong WW, Leunissen JA, Voorter CE** (1993) Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol* **10**: 103-126
- Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC** (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1479-1487
- Dudich IV, Zav'yalov VP, Pfeil W, Gaestel M, Zav'yalova GA, Denesyuk AI, Korpela T** (1995) Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. *Biochim Biophys Acta* **1253**: 163-168
- Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J** (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* **16**: 221-229
- Ehrt S, Schnappinger D** (2003) Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *Methods Mol Biol* **235**: 75-78
- Eisenhardt BD, Forreiter, Christoph** (2012) Insights in small Heat Shock Protein/client interaction by combined protection analysis of two different client proteins. *FEBS Letters*
- Ellis RJ, Hartl, F. U.** (1996) Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *Faseb J* **10**: 20-26
- Ellis RJ, Hartl, F. U.** (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 102-110
- Ellis RJ, van der Vies, S. M., Hemmingsen, S. M.** (1989) The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* **55**: 145-153
- Essen LO, Mailliet J, Hughes J** (2008) The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14709-14714
- Feliciello I, Chinali G** (1993) A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **212**: 394-401
- Feng YM, Zhang YM, Jing GZ** (2002) Soluble expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of a human TF-1 cell apoptosis-related protein TFAR19. *Protein Expr Purif* **25**: 323-329

- Forreiter C, Kirschner M, Nover L** (1997) Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell* **9**: 2171-2181
- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC** (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**: 965-978
- Franz Narberhaus MH** (2008) Small Heat Shock Proteins: Dynamic Players in the Folding Game. In PDK Prof. Dr. Johannes Buchner, ed, *Protein Folding Handbook*, pp 830-857
- Fu X, Chang Z** (2004) Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16.3, a small heat shock protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 291-299
- Furuya S, Eberhard** (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends in Plant Science* **1**: 301-307
- Giese KC, Basha E, Catague BY, Vierling E** (2005) Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of in vitro chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18896-18901
- Giese KC, Vierling E** (2004) Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state. Analysis and allele-specific suppression. *J Biol Chem* **279**: 32674-32683
- Giese KC, Vierling E** (2002) Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **277**: 46310-46318
- Guan JC, Jinn TL, Yeh CH, Feng SP, Chen YM, Lin CY** (2004) Characterization of the genomic structures and selective expression profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **56**: 795-809
- Hamilton TM, Dobie-Galuska AA, Wietstock SM** (1999) The o-Phenylenediamine-Horseradish Peroxidase System: Enzyme Kinetics in the General Chemistry Laboratory. *Journal of Chemical Education* **76**: 642
- Harndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C** (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* **4**: 129-138
- Harndahl U, Kokke BP, Gustavsson N, Linse S, Berggren K, Tjerneld F, Boelens WC, Sundby C** (2001) The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic  $\alpha$ -helix. *Biochim Biophys Acta* **1545**: 227-237
- Haslbeck M** (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1649-1657
- Haslbeck M, Kastenmuller A, Buchner J, Weinkauff S, Braun N** (2008) Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J Mol Biol* **378**: 362-374
- Haslbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S, Buchner J** (2005) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem* **280**: 23861-23868
- Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J** (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *Embo J* **18**: 6744-6751
- Head MW, Corbin E, Goldman JE** (1993) Overexpression and abnormal modification of the stress proteins  $\alpha$ B-crystallin and HSP27 in Alexander disease. *Am J Pathol* **143**: 1743-1753
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY** (1995) Improved green fluorescence. *Nature* **373**: 663-664

- Helfman DM, Fiddes JC, Hanahan D** (1987) Directional cDNA cloning in plasmid vectors by sequential addition of oligonucleotide linkers. *Methods Enzymol* **152**: 349-359
- Helm KW, Lee GJ, Vierling E** (1997) Expression and native structure of cytosolic class II small heat-shock proteins. *Plant Physiol* **114**: 1477-1485
- Helm V, E.** (1989) An *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a low molecular weight heat shock protein. *Nucleic Acids Res* **17**: 7995
- Herbert DA, Jr.** (2002) *Biotic Stress and Yield Loss.* : Edited by R.K.D. PATTERSON and L.G. HIGLEY. CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd., Boca Raton, FL 33431. 2001. Hardback, 261 pp., \$89.95. ISBN 0-8493-1145-4. *Crop Sci* **42**: 656-657
- Hilario E, Martin FJ, Bertolini MC, Fan L** (2011) Crystal structures of *Xanthomonas* small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer. *J Mol Biol* **408**: 74-86
- Hong-Bo S, Zong-Suo L, Ming-An S** (2005) LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* **45**: 131-135
- Hong V, E.** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4392-4397
- Horwitz J** (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10449-10453
- Hubschmann T, Borner T, Hartmann E, Lamparter T** (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **268**: 2055-2063
- Hunt P, L. H.** (1981) Physicochemical differences between the red- and the far-red-absorbing forms of phytochrome. *Biochemistry* **20**: 941-945
- Hurle MR, Matthews, C. R.** (1987) Proline isomerization and the slow folding reactions of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **913**: 179-184
- Jakoby MJ, Falkenhan D, Mader MT, Brininstool G, Wischnitzki E, Platz N, Hudson A, Hulskamp M, Larkin J, Schnittger A** (2008) Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that NOECK encodes the MIXTA-like transcriptional regulator MYB106. *Plant Physiol* **148**: 1583-1602
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Jaya N, Garcia V, Vierling E** (2009) Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15604-15609
- Jehle S, Rajagopal P, Bardiaux B, Markovic S, Kuhne R, Stout JR, Higman VA, Klevit RE, van Rossum BJ, Oschkinat H** (2010) Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1037-1042
- Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJ, Burgman PW, Konings AW** (1995) Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp Cell Res* **219**: 536-546
- Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC** (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**: 662-666
- Kim DH, Xu ZY, Na YJ, Yoo YJ, Lee J, Sohn EJ, Hwang I** (2011) Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **157**: 132-146
- Kim KK, Kim R, Kim SH** (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-599
- Kim R, Kim KK, Yokota H, Kim SH** (1998) Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9129-9133

- Kim R, Lai L, Lee HH, Cheong GW, Kim KK, Wu Z, Yokota H, Marqusee S, Kim SH** (2003) On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8151-8155
- Kirschner M, Winkelhaus S, Thierfelder JM, Nover L** (2000) Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts. *Plant J* **24**: 397-411
- Kotak S, Vierling E, Baumlein H, von Koskull-Doring P** (2007) A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 182-195
- Kumar LV, Ramakrishna T, Rao CM** (1999) Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins. *J Biol Chem* **274**: 24137-24141
- Lamparter T, Esteban B, Hughes J** (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur J Biochem* **268**: 4720-4730
- Lamparter T, Mittmann F, Gartner W, Borner T, Hartmann E, Hughes J** (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11792-11797
- Landgraf FT, Forreiter C, Hurtado Pico A, Lamparter T, Hughes J** (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **508**: 459-462
- Lane BG** (1991) Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J* **5**: 2893-2901
- Lauzon LM, Helm KW, Vierling E** (1990) A cDNA clone from *Pisum sativum* encoding a low molecular weight heat shock protein. *Nucleic Acids Res* **18**: 4274
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E** (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem* **270**: 10432-10438
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E** (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *Embo J* **16**: 659-671
- Lee U, Wie C, Escobar M, Williams B, Hong SW, Vierling E** (2005) Genetic Analysis Reveals Domain Interactions of *Arabidopsis* Hsp100/ClpB and Cooperation with the Small Heat Shock Protein Chaperone System. *Plant Cell* **17**: 559-571
- Lee V, E.** (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**: 189-198
- Lee Y, Nagao RT, Lin CY, Key JL** (1996) Induction and Regulation of Heat-Shock Gene Expression by an Amino Acid Analog in Soybean Seedlings. *Plant Physiol* **110**: 241-248
- Levitt M** (1981) Effect of proline residues on protein folding. *J Mol Biol* **145**: 251-263
- Li S, P.** (2004) Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 1**: Appendix 1T
- Lobley A, Whitmore L, Wallace BA** (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**: 211-212
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P** (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. *Plant Physiol* **137**: 1130-1138
- Lubaretz O, Zur Nieden, U.** (2002) Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. *Planta* **215**: 220-228
- Ludwig-Muller J, Krishna P, Forreiter C** (2000) A glucosinolate mutant of *Arabidopsis* is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. *Plant Physiol* **123**: 949-958

- Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR, Jr.** (2008) Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol.*: pcn185
- Mechin V, Damerval C, Zivy M** (2007) Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**: 1-8
- Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schonfeld HJ, Vierling E, Bukau B** (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem* **278**: 31033-31042
- Montgomery L, J. C.** (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**: 357-366
- Nover L, Bharti K, Doring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD** (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* **6**: 177-189
- Nover L, Scharf KD, Gagliardi D, Vergne P, Czarnecka-Verner E, Gurley WB** (1996) The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* **1**: 215-223
- Nover L, Scharf KD, Neumann D** (1983) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* **3**: 1648-1655
- Nover L, Scharf KD, Neumann D** (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**: 1298-1308
- Nover S, K. D.** (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **53**: 80-103
- Panepucci L, Fernandes MN, Sanches JR, Rantin FT** (2000) Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae). *Rev Bras Biol* **60**: 353-360
- Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M** (2004) The IXI/V motif in the C-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies. *Mol Vis* **10**: 655-662
- Pelham B, M.** (1982) A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *EMBO J* **1**: 1473-1477
- Pelham HR** (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* **30**: 517-528
- Plesofsky-Vig V, Brambl, R.** (1992) Phylogeny of the alpha-crystallin-related heat-shock proteins. *J Mol Evol* **35**: 537-545
- Polier S, Dragovic Z, Hartl FU, Bracher A** (2008) Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell* **133**: 1068-1079
- Port M, Tripp J, Zielinski D, Weber C, Heerklotz D, Winkelhaus S, Bublak D, Scharf KD** (2004) Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol* **135**: 1457-1470
- Poulain P, Gelly JC, Flatters D** (2010) Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS One* **5**: e9990
- Quail PH, Briggs WR, Chory J, Hangarter RP, Harberd NP, Kendrick RE, Koornneef M, Parks B, Sharrock RA, Schafer E, Thompson WF, Whitelam GC** (1994) Spotlight on Phytochrome Nomenclature. *Plant Cell* **6**: 468-471
- Quail PH, Colbert JT, Peters NK, Christensen AH, Sharrock RA, Lissemore JL** (1986) Phytochrome and the regulation of the expression of its genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **314**: 469-480
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S** (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 479-492

- Raison JK, Pike CS, Berry JA** (1982) Growth Temperature-Induced Alterations in the Thermotropic Properties of Nerium oleander Membrane Lipids. *Plant Physiol* **70**: 215-218
- Rao PV, Horwitz J, Zigler JS, Jr.** (1993) Alpha-crystallin, a molecular chaperone, forms a stable complex with carbonic anhydrase upon heat denaturation. *Biochem Biophys Res Commun* **190**: 786-793
- Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, Pierce KL, Pepperl DJ, Zhang D, Kedzie KM, Fairbairn CE, Bogardus AM, Woodward DF, et al.** (1994) Molecular cloning and expression of human EP3 receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini. *Br J Pharmacol* **112**: 377-385
- Remberg A, Lindner I, Lamparter T, Hughes J, Kneip C, Hildebrandt P, Braslavsky SE, Gartner W, Schaffner K** (1997) Raman spectroscopic and light-induced kinetic characterization of a recombinant phytochrome of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Biochemistry* **36**: 13389-13395
- Renkawek K, de Jong WW, Merck KB, Frenken CW, van Workum FP, Bosman GJ** (1992) alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* **83**: 324-327
- Renkawek K, Voorter CE, Bosman GJ, van Workum FP, de Jong WW** (1994) Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **87**: 155-160
- Ritossa F** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **18**: 571-573
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC** (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 837-858
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M** (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* **274**: 18947-18956
- Rohmer T, Lang C, Hughes J, Essen LO, Gartner W, Matysik J** (2008) Light-induced chromophore activity and signal transduction in phytochromes observed by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N magic-angle spinning NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15229-15234
- Sambrook R, David W.** (2006) The condensed protocols from molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. :
- Sanmiya K, Suzuki K, Egawa Y, Shono M** (2004) Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Lett* **557**: 265-268
- Scharf KD, Heider H, Hohfeld I, Lyck R, Schmidt E, Nover L** (1998) The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol* **18**: 2240-2251
- Scharf KD, Siddique M, Vierling E** (2001) The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* **6**: 225-237
- Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E** (1994) An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**: 1899-1909
- Selye H** (1975) Confusion and controversy in the stress field. *J Human Stress* **1**: 37-44
- Selye H** (1975) Stress and distress. *Compr Ther* **1**: 9-13
- Sharma KK, Kumar GS, Murphy AS, Kester K** (1998) Identification of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *J Biol Chem* **273**: 15474-15478
- Sharrock RA** (2008) The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* **9**: 230



- Shi L, Palleros DR, Fink AL** (1994) Protein conformational changes induced by 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK. *Biochemistry* **33**: 7536-7546
- Shinohara H, Inaguma Y, Goto S, Inagaki T, Kato K** (1993) Alpha B crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **119**: 203-208
- Siddique M, Gernhard S, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD** (2008) The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones* **13**: 183-197
- Siddique M, Port M, Tripp J, Weber C, Zielinski D, Calligaris R, Winkelhaus S, Scharf KD** (2003) Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones* **8**: 381-394
- Smulders RH, Merck KB, Aendekerk J, Horwitz J, Takemoto L, Slingsby C, Bloemendal H, De Jong WW** (1995) The mutation Asp69-->Ser affects the chaperone-like activity of alpha A-crystallin. *Eur J Biochem* **232**: 834-838
- Sorger P, H. R.** (1987) Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells. *Embo J* **6**: 993-998
- Sorger PK, Lewis MJ, Pelham HR** (1987) Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* **329**: 81-84
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L** (1999) Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol* **120**: 521-528
- Stamler R, Kappe G, Boelens W, Slingsby C** (2005) Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J Mol Biol* **353**: 68-79
- Stengel F, Baldwin AJ, Painter AJ, Jaya N, Basha E, Kay LE, Vierling E, Robinson CV, Benesch JLP** (2011) Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2007-2012
- Stromer T, Ehrnsperger M, Gaestel M, Buchner J** (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem* **278**: 18015-18021
- Sun M, T. H.** (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2460-2476
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125
- Takahashi K, Y.** (1989) Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **219**: 365-372
- Takemoto L, Emmons T, Horwitz J** (1993) The C-terminal region of alpha-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation. *Biochem J* **294** ( Pt 2): 435-438
- Thomas JG, Baneyx, F.** (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *In vivo*. *J Bacteriol* **180**: 5165-5172
- Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* **15**: 5890
- Topfer R, Schell J, Steinbiss HH** (1988) Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 8725
- Torok Z, Goloubinoff P, Horvath I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L** (2001) *Synechocystis* HSP17 is an

- amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3098-3103
- Treuter E, Nover L, Ohme K, Scharf KD** (1993) Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol Gen Genet* **240**: 113-125
- Tripp J, Mishra SK, Scharf KD** (2009) Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant Cell Environ* **32**: 123-133
- Tsvetkova NM, Horvath I, Torok Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L** (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13504-13509
- Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E** (2001) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**: 105-156
- van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E** (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* **8**: 1025-1030
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**: 244-252
- Waters ER** (1995) The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**: 785-795
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-338
- Waters V, E.** (1999) The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol Evol* **16**: 127-139
- Weber C, Nover L, Fauth M** (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J* **56**: 517-530
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* **112**: 747-757
- Wehmeyer V, E.** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol* **122**: 1099-1108
- Whitelam GC, Patel S, Devlin PF** (1998) Phytochromes and photomorphogenesis in Arabidopsis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1445-1453
- Whitmore L, Wallace BA** (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**: W668-673
- Whitmore L, Wallace BA** (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**: 392-400
- Wittig I, Braun HP, Schagger H** (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**: 418-428
- Wollgiehn R, Neumann D, Zur Nieden U, Musch A, Scharf KD, Nover L** (1994) Intracellular Distribution of Small Heat Stress Proteins in Cultured Cells of *Lycopersicon peruvianum*. *Journal of Plant Physiology* **144**: 491-499
- Zhang H, Fu X, Jiao W, Zhang X, Liu C, Chang Z** (2005) The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 1055-1061

## 6 Anhang

### 6.1 Schematische Übersicht der verwendeten Vektoren

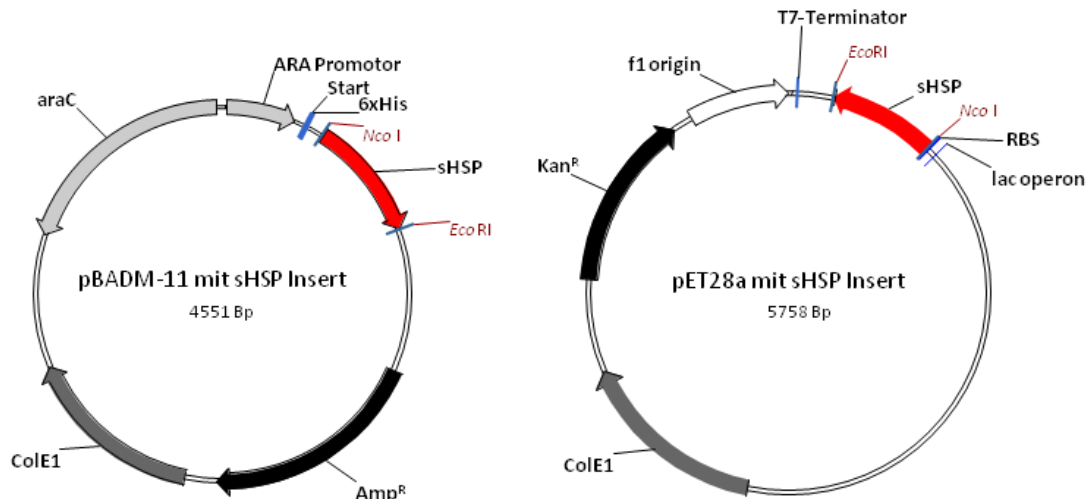


Abbildung 44: Schema der verwendeten Expressionsvektoren (*E. coli*)

(Linke Seite): Expressionsvektor pBADM-11 mit sHSP Insert, sowie der Darstellung einiger wichtiger Sequenzabschnitte benötigt für die Selektion (*Amp<sup>R</sup>*), sowie Propagierung in *E. coli* (*ColE1*). Expression wurde in *E. coli* mit Arabinose induziert und führte zu einem N-Terminal His6-Epitop tragenden sHSP mit TEV-Protease Schnittstelle zum Abtrennen des Epitops. Die Positionen der für die meisten sHSP Inserts verwendeten Schnittstellen wurden markiert (Nco I / Eco RI).

(Rechte Seite): Expressionsvektor pET28a mit sHSP Insert, sowie der Darstellung einiger wichtiger Sequenzabschnitte benötigt für die Selektion (*Kan<sup>R</sup>*), sowie Propagierung in *E. coli* (*ColE1*). sHSP Expression wurde in *E. coli* mit IPTG induziert und durch die für sHSP Integrierung verwendeten Schnittstellen wurde ein His6-Epitop freies sHSP produziert (Eco RI / Nco I).

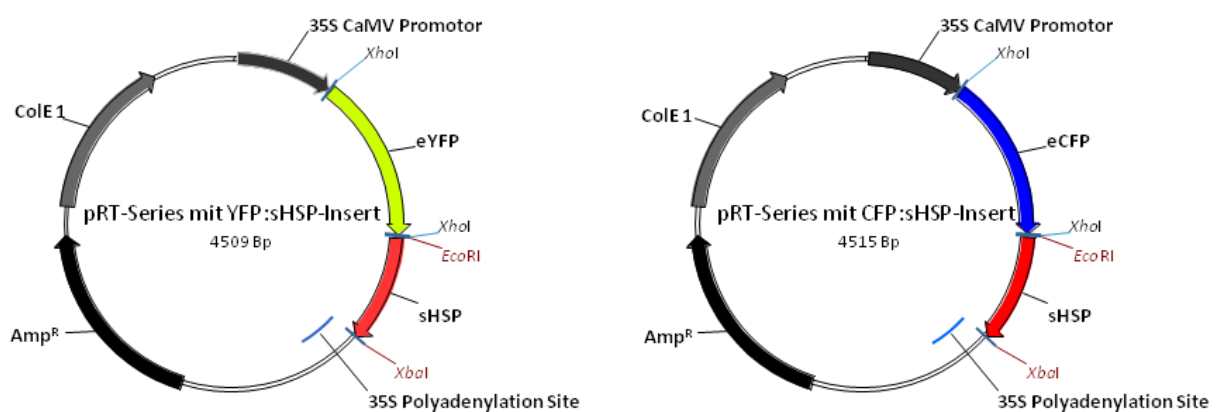


Abbildung 45: Schema der verwendeten *in situ* Expressionsvektoren (Zwiebelepidermis)

(Linke Seite): *In vivo* Expressionsvektor pRT mit schematischem YFP:sHSP Insert, sowie der Darstellung einiger wichtiger Sequenzabschnitte benötigt für die Selektion (*Amp<sup>R</sup>*), sowie Propagierung in *E. coli* (*ColE1*), sowie dem für Expression in pflanzlichen Geweben geeigneten 35S CaMV Promotorelement. Die Positionen der für die sHSP Inserts verwendeten Schnittstellen wurden markiert (Eco RI / Xba I).

(Rechte Seite): *In vivo* Expressionsvektor pRT mit schematischem CFP:sHSP Insert. Eigenschaften ansonsten wie bereits beschrieben.

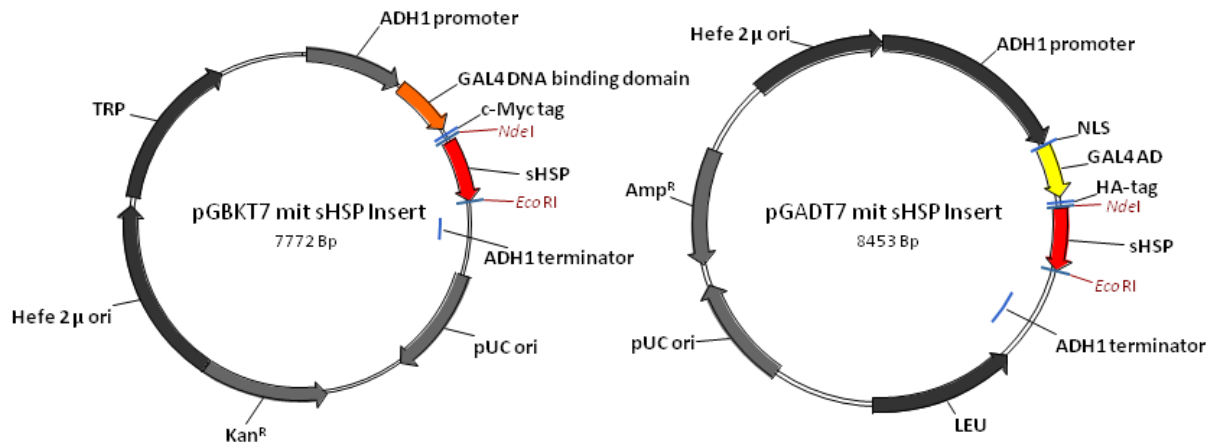


Abbildung 46: Schema der in der Hefe 2-Hybridanalyse verwendeten Vektoren

(Linke Seite): Hefe 2-Hybridvektor pGBKT7 mit schematischen sHSP Insert, sowie der Darstellung einiger wichtiger Sequenzabschnitte benötigt für die Selektion ( $Kan^R$ ), sowie Propagierung in *E. coli* (pUC ori). Weiterhin wurden wichtige Abschnitte für die Selektion (TRP) und Vervielfältigung (2  $\mu$  ori) des Vektors in Hefen angegeben. Der ADH Promotor diene der konstitutiven Expression einer GAL4 DNA Bindedomäne - sHSP Fusion in Hefen.

(Rechte Seite): Hefe 2-Hybridvektor pGADT7 mit schematischen sHSP Insert, sowie der Darstellung einiger wichtiger Sequenzabschnitte benötigt für die Selektion ( $Amp^R$ ), sowie Propagierung in *E. coli* (pUC ori). Weiterhin wurden wichtige Abschnitte für die Selektion (Leu) und Vervielfältigung (2  $\mu$  ori) des Vektors in Hefen angegeben. Der ADH Promotor diene der konstitutiven Expression einer GAL4 Aktivatorodomäne - sHSP Fusion mit N-terminalen *Nuclear localization signal* (NLS) in Hefen. Dieser Promotor wird durch Ethanol Anreicherung während der späten logarithmischen Wachstumsphase runter reguliert. In beide Vektoren wurde die entsprechende sHSP Sequenz über die NdeI / EcoRI Schnittstelle eingefügt.

## 7 Danksagung

Ich möchte meinem Arbeitsgruppenleiter PD. Dr. Forreiter danken, welcher mir die Möglichkeit gab an diesem Projekt zu arbeiten. Weiterhin gilt mein Dank dem Biochemischen Institut der Justus-Liebig Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Pingoud, für die Möglichkeit weiterführende Analysen durchzuführen (CD-Spektroskopie). Im Besonderen danke ich Daniel, Marika und Benno für hilfreiche Unterstützung bei den Messungen und bei der Dateninterpretation.

Das gleiche gilt für die anderen Arbeitsgruppen im Pflanzenphysiologischen Institut der Justus-Liebig Universität. Der Arbeitsgruppen Hughes und Zeidler bin ich zum Dank verpflichtet für die Bereitstellung von Materialien, Ideen und hilfreichen Tipps und Tricks. Danke Anna-Lena, Anette, Claudia J.-B., George, Jo, Jon, Kathie, Mathias, Melanie, Roland, Tanja und Tina.

Eine wichtige Unterstützung während dieses Projektes waren Andrea Weisert und Claudia Olbrich die mir während der Analysen tatkräftig zur Seite standen. Im besonderen Claudia O., welche im Rahmen ihrer von mir praktisch betreuten Examensarbeit, unter meiner Anleitung den Hefe 2-Hybrid Interaktionsassay mit den Deletionskonstrukten untersuchte und dieser Arbeit beisteuerte. Einen weiteren Dank gilt meinen ehemaligen Bachelorstudenten Anja Bäcker und Sina Rogge, welche an wichtigen Vorarbeiten zu Teilprojekten dieser Arbeit involviert waren.

Einen besonderen Dank an Felix Buchert, mit dem ich das Studium und die Doktorarbeit gemeinsam durchgekämpft habe, auch in Phasen von Rückschlägen haben wir es geschafft uns nicht unterkriegen zu lassen.

Einen sehr herzlichen und großen Dank an meine Familie (Eltern und Großeltern) für ihre Geduld und finanzielle Unterstützung. Ich danke für die wissenschaftliche Expertise meines Bruders Steffen, der mit Nils auch eine große moralische Unterstützung war. Zum Schluss entschuldige ich mich bei Julius, dass ich während meiner Arbeit nicht die nötige Zeit für ihn finden konnte.

Zuletzt danke ich allen ehemaligen Kommilitonen und Freunden daheim, für Unterstützung und Abwechslung in einem sehr puritanischen, Nerven aufreibenden Forscheralltag.

### **Stellungnahme**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Benjamin Dennis Eisenhardt